VERSUCHE ZUR BESTIMMUNG DES NUKLEINSÄURETYPS UND ZUM NACHWEIS VON REVERSER TRANSKRIPTASE BEI BORNA-VIRUS

Dorothea Weber

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0040

Aus dem Institut für Biologie,
Abteilung Pathologie
(Leiter: Prof. Dr. W. Gössner)
der Gesellschaft für Strahlen-
und Umweltforschung, Neuherberg

und aus dem

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität München

(VORSTAND: Prof.Dr.DDr.h.c. A. Mayr)

VERSUCHE ZUR BESTIMMUNG DES NUKLEINSÄURETYPS UND ZUM NACHWEIS VON REVERSER TRANSKRIPTASE BEI BORNA-VIRUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Dorothea Weber
aus
Mannheim
München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof.Dr. J.v.Sandersleben
Referent: Prof.Dr.DDr.h.c. A.Mayr
Korreferent: Prof.Dr. E.Munz

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Promotion: 29. Februar 1980

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1	Methoden zur Typisierung viraler Nukleinsäuren und ihre Anwendung	2
2.1.1	Acridin-Orange-Färbung	2
2.1.2	Einbau von radioaktiv markierten Nukleinsäure-Bausteinen in die virale Nukleinsäure	7
2.1.3	Gezielte Hemmung der Virusvermehrung durch Einsatz von Antimetaboliten	10
2.1.3.1	Halogenierte Nukleoside (z.B. 5-Jod-2'-Desoxyuridin)	10
2.1.3.2	Actinomycin D (Actinomycin C)	15
2.1.3.3	Distamycin A	20
2.1.3.4	Mitomycin C	22
2.1.3.5	Rifamycin und seine Derivate	26
2.1.3.6	1-ß-D-Arabinofuranosyl-Cytosin (D-Arabinosyl-Cytosin, Ara-C)	31
2.1.3.7	6-Azauracil Ribonukleosid (6-Azauridin)	36
2.2	Nachweis der reversen Transkriptase	41
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	45
3.1	Material und Methoden	45
3.1.1	Zellkulturen	45
3.1.2	Virus	46
3.1.3	Antimetaboliten	47

3.1.4	Radioaktiv markierte Nukleoside	47
3.1.5	Bei der Acridin-Orange-Färbung verwendete Substanzen und Lösungen	48
3.1.6	Beim Nachweis der reversen Transkriptase verwendete Substanzen	48
3.1.7	Konjugate zur fluoreszenzserologischen Virustitration	50
3.1.8	Virustitration	50
3.1.9	Acridin-Orange-Färbung	51
3.1.10	Viruszüchtung in Gegenwart von Antimetaboliten	51
3.1.11	Zugabe radioaktiv markierter Nukleoside zur Virusvermehrung	52
3.1.11.1	Markierung	52
3.1.11.2	Nachweis der eingebauten Radioaktivität	52
3.1.12	Nachweis der reversen Transkriptase	53
3.1.12.1	Konzentrierung und Reinigung des Virusmaterials	53
3.1.12.2	Durchführung des Enzym-Tests	54
3.2	Versuche und Ergebnisse	55
3.2.1	Bestimmung des Virus-Nukleinsäure-Typs mittels Acridin-Orange	55
3.2.2	Bestimmung des Nukleinsäure-Typs mit Hilfe von Antimetaboliten	55
3.2.2.1	Bestimmung der Zelltoxizität der Antimetaboliten	56
3.2.2.2	Hemmung der Virusvermehrung durch Antimetaboliten	57
3.2.2.3	Abhängigkeit der Vermehrungshemmung bzw. -steigerung bei Borna-Virus vom Zeitpunkt des Antimetaboliten-Zusatzes	67
3.2.2.4	Einfluß höherer Actinomycin D-Konzentrationen auf die Vermehrung von Borna-Virus	68

3.2.3 Bestimmung des Nukleinsäure-Typs über den Einbau radioaktiv markierter Nukleoside 72

3.2.3.1 Vorversuch 73

3.2.3.2 Hauptversuch 73

3.2.4 Versuche zum Nachweis der reversen Transkriptase 82

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 88

5. ZUSAMMENFASSUNG 93

6. SUMMARY 95

7. LITERATURVERZEICHNIS 97

1. EINLEITUNG

Borna-Virus ist bislang nicht klassifiziert. Einer der Hauptgründe hierfür ist die Tatsache, daß es bis vor wenigen Jahren nicht möglich war, mit diesem Erreger unter standardisierten Bedingungen im Labor zu arbeiten. Erst die gelungene Viruszüchtung in der Zellkultur durch MAYR und DANNER (87, 88) sowie der Virusnachweis mittels Immunofluoreszenz nach Danner und Mayr (24) haben die Grundlage für eine genauere Charakterisierung des Borna-Virus geschaffen. Man kennt inzwischen einige wichtige Viruseigenschaften wie Größe, Empfindlichkeit gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen, Zellspektrum etc. (23, 25). Als wesentliches Kriterium für die Einordnung von Virusarten gilt jedoch die Art der im Virusgenom vorhandenen Nukleinsäure (RNS oder DNS), die bei Borna-Virus bislang nicht eindeutig definiert ist. Mit Untersuchungen über den Nukleinsäure-Typ des Bornavirus sollte die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur weiteren Erforschung dieses Erregers und zu seiner Klassifizierung leisten.

Außer dem Nukleinsäure-Typ sind auch bestimmte bei der Virusvermehrung ablaufende Mechanismen wesentlich für die Kenntnis des Virus-Zell-Systems. Als ein besonders wichtiges Phänomen ist in den letzten Jahren die Wirkungsweise der sogenannten "reversen Transkriptase" erkannt worden, durch die RNS-Viren zu Provirus-DNS umgestaltet werden können. Durch die Integrierung von Provirus ins Zellgenom kommt es zu einschneidenden Konsequenzen im Virus-Zell-System. Neben der Zelltransformation ist hierbei vor allem die praktisch unbegrenzte Viruspersistenz zu nennen. Da auch Borna-Virus sowohl in vivo als auch in vitro zur Persistenz fähig ist (89), war es interessant, zu erfahren, ob auch in diesem System die Aktivität einer reversen Transkriptase zugrunde liegt. Auch hiermit befaßt sich der vorliegende Beitrag.

2. SCHRIFTTUM

2.1 METHODEN ZUR TYPISIERUNG VIRALER NUKLEINSÄUREN UND IHRE ANWENDUNG

Zur Typisierung viraler Nukleinsäure sind die verschiedensten Techniken eingesetzt worden. Im folgenden werden diejenigen beschrieben, die sich in den letzten Jahren bzw. Jahrzehnten bewährt und häufig die Grundlage für Viruscharakterisierungen dargestellt haben. Grundsätzlich läßt sich die Nukleinsäure-Bestimmung direkt (z.B. Anfärbung mit Acridin-Orange) und indirekt durchführen (z. B. Einsatz von Antimetaboliten im Virus-Zell-System).

2.1.1 Acridin-Orange-Färbung

Mit Acridinorange lassen sich DNS und RNS anfärben (8, 10, 20, 66, 83, 84, 125). Doppelsträngige (ds) DNS wie auch RNS zeigen eine gelb-grüne Fluoreszenz, während einfachsträngige (ss) RNS und DNS orangefarben bis rot fluoreszieren. Die unterschiedliche Färbung der Nukleinsäuren wird durch die Art der Farbbindung an die Nukleinsäure-Moleküle verursacht. Die Farbmoleküle binden sich bei einfachsträngigen Nukleinsäuren intensiver an die Phosphatgruppen als bei doppelsträngigen (83, 125). Bei der Farbbindung an ss Nukleinsäuren verschiebt sich das Adsorptionsspektrum der Farbe von 490 nm (Wellenlänge der maximalen Adsorption von ungebundener Farbe) zu 465 nm mit einer daraus resultierenden roten Fluoreszenz. Die Bindung von Acridinorange an ds Nukleinsäuren ist bedeutend lockerer. Die Farbmoleküle werden zum Teil zwischen benachbarte Basenpaare, in einer Ebene senkrecht zur Helix-Achse,eingeschoben. Das Adsorptionsspektrum der Farbe verschiebt sich bei der Färbung ds Nukleinsäure von 490 nm zu 502 nm und es kommt zu einer gelblichgrünen Emission (125).

Für die Virusforschung ist von Bedeutung, daß intrazelluläre virale Nukleinsäuren wie auch Nukleinsäuren von gereinigten Virusmaterialien mit Acridinorange gefärbt werden können. Zusätzliche Anwendung von Enzymen (RNase, DNase) bringt bei der Acridin-Orange-Färbung eine weitere Differenzierungsmöglichkeit (83, 125).

I. Acridin-Orange-Färbung von intrazellulärem Virus

Besonders geeignet sind diejenigen Virusarten, bei denen es zur Ausbildung von Einschlußkörperchen kommt. Einige Beispiele für intrazellulär mit Acridin-Orange gefärbtes Virusmaterial bringt die Tabelle 1.

Da das Ergebnis der Acridin-Orange-Färbung vom Grad der Farbbindung an die Nukleinsäure abhängt, müssen Faktoren, die diese Bindung beeinflussen, z. B. die Farbkonzentration, der ph-Wert und die Färbezeit, kontrolliert werden (83, 125). MAYOR (83) gibt eine Färbetechnik an, bei der die unspezifische Extinktion der Nukleinsäure so gering wie möglich gehalten wird, und bei der auch kleine Mengen einer labilen Nukleinsäure in infizierten Zellen entdeckt werden können. Die Ergebnisse der Acridin-Orange-Färbung müssen jedoch vorsichtig interpretiert werden, da auch Proteine (z. B. virales Antigen) angefärbt werden können (148), die dann grün fluoreszieren. Dies wurde z. B. von KASTEN und CHURCHILL (85) bei Versuchen mit bovinem Parainfluenza 3-Virus nachgewiesen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei Parvo-Viren (siehe Tab. 1) kommen nach der Vermutung von RABSON et al. (107) sowie HAMPTON (47) dadurch zustande, daß Nukleinsäure in einer bestimmten Replikationsphase in doppelsträngiger Form vorliegt. Für einige Viren der Gruppe konnte diese Hypothese experimentell bewiesen werden (124). Es ist daher wichtig, zu welchem Zeitpunkt des Replikationszyklus die Färbung vorgenommen wird.

Tabelle 1: Färbung von intrazellulärem Virusmaterial mit Acridin-Orange

Virus	Nukleinsäure-Typ	Färbung	Literatur
Adenovirus Typ 3, 7, 11, 15, 39	ds DNS	grün	8, 83
Afrikanisches Schweinepest-Virus	ds DNS	grün	53
Lumpy Skin Disease-Virus	ds DNS	grün	148
Parvoviren RF, H-1, H-3, X-14-Virus	ss DNS	grün	124
Felines Panleukopenie-Virus (Parvo-Virus)	ss DNS	gelb-grün	124
Adeno-assoziiertes DNS-Virus (AAV)	ss DNS	rot	8
Polio-Virus	ss RNS	rot	83
Rinderpest-Virus	ss RNS	rot	103
Reovirus	ds RNS	gelb-grün	116

II. Acridin-Orange-Färbung von extrahierter Virusnukleinsäure

Bei der Färbung von gereinigtem Virusmaterial ist die Bindung von Acridin-Orange besonders von der Permeabilität des Virus und der Beziehung des viralen Proteinmantels zur Nukleinsäure abhängig. CARNOY'S Lösung verändert die Permeabilität des Virus und erleichtert die Färbung. Vergleichende Farbreaktionen von fixierten und unfixierten Virus-Präparaten bringen Informationen über die Permeabilität des Virus-Kapsids, die Wechselwirkung zwischen Kapsid und Nukleinsäure und über die photodynamische Inaktivierung der Viren (125). Einige Beispiele für gefärbte, extrahierte Virusnukleinsäure bringt die Tabelle 2.

III. Enzym-Test

Durch die Anwendung geeigneter Enzyme (DNase, RNase) vor der Färbung mit Acridin-Orange ist es möglich, RNS von DNS zu unterscheiden. Zur "Verdauung" von ds und ss DNS von Bakteriophagen genügt eine einfache DNase-Behandlung, während die ds DNS animaler Viren vor der DNase-Behandlung die Verdauung mit proteolytischen Enzymen (Pepsin, Papain) erfordert. RNS ist gegenüber einer RNase-Behandlung empfindlich, wobei aber beachtet werden muß, daß die RNS einiger Viren (z. B. die RNS von Reo-Virus) gegenüber RNase resistent ist. Bei diesen Enzym-Tests werden meist Pankreas-DNase und -RNase benutzt (83, 125)

Tabelle 2: Färbung extrahierter Virusnukleinsäure mit Acridin-Orange

V i r u s	Nukleinsäure-Typ	Färbung	Literatur
Adenoviren	ds DNS	grün	86
Parvo-Virus	ss DNS	rot	60, 85, 86, 124
Reovirus	ds RNS	grün	125
Tobacco mosaic-Virus	ss RNS	rot	84
Poliovirus	ss RNS	rot	84

2.1.2 Einbau von radioaktiv markierten Nukleinsäurebausteinen in die virale Nukleinsäure

I. Wirkungsmechanismus

Der unterschiedliche Aufbau von DNS und RNS ist die Grundlage einer einfachen Methode zur Differenzierung von RNS- und DNS-Viren. Dem sich vermehrenden Virus bietet man radioaktiv markierte Nukleinsäurebausteine an, im allgemeinen Pyrimidin-Nukleoside (vorteilhafter als der Gebrauch der Basen). Thymidin wird dann nur bei der Replikation von DNS-Viren verwendet, während Uridin hauptsächlich von RNS-Viren benützt wird. Es kann zwar auch in virale DNS eingebaut werden, da Uridin zu Desoxycytidinmonophosphat (dCMP) und Desoxyuridinmonophospat (dUMP) umgewandelt werden kann, der Einbau ist aber bedeutend geringer (20, 52, 123).

II. Überblick über die Technik

Einer virusinfizierten Zellkultur wird über das Medium radioaktiv markiertes Uridin bzw. Thymidin zugesetzt.
Es ist von Vorteil, wenn das Medium keine nicht-markierten Nukleoside enthält. Die Zeitdauer der Markierung und der Zeitpunkt der Zugabe, die auch vor der Infizierung erfolgen kann, hängt von der jeweiligen Virusart und ihrer Replikationsgeschwindigkeit ab (20). Die Konzentration für die markierten Nukleosidbasen variiert von 1µCi/ml - 50 µCi/ml für ^{3}H-Uridin mit einer spezifischen Aktivität von 20 - 50 Ci/mmol (14, 17, 32, 46, 49, 59, 75, 97, 100, 102, 133) und von 1µCi/ml - 30 µCi/ml für ^{3}H-Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 10 - 30 Ci/mmol (14, 49, 100, 102).

Zur Auswertung wird das neusynthetisierte Virus aus der Zellkultur gewonnen. Zur Bestimmung des Nukleinsäuretyps muß das entsprechende radioaktiv markierte Nukleosid mit einer bestimmten definierten viralen Eigenschaft übereinstimmen. Als Krite-

rium dient im allgemeinen die Virusdichte. Das heißt also, daß das Maximum der Radioaktivität mit der Hauptmenge des Virus übereinstimmen muß. Das Virus kann über Infektiosität oder sonstige Aktivitäten identifiziert und quantifiziert werden. Der Einbau der radioaktiv markierten Nukleoside in nicht infizierten Kontrollkulturen muß signifikant niedriger sein. Über den Nachweis des radioaktiv markierten Bestandteils kann die neu synthetisierte virale Nukleinsäure in ihrem Typ definiert, aber auch in ihrer Struktur weitergehend analysiert werden (z. B. Sedimentationsgeschwindigkeit). Andererseits dient der Nachweis der Radioaktivität auch zur Dichtebestimmung bisher unbekannter oder wenig definierter Virusarten (14, 17, 20, 46, 49, 59, 75, 95, 100, 102).

III. Anwendung

Diese Technik wird bei einer Reihe von Viren angewandt und gilt generell als Beweis für den Nukleinsäuretyp. Die Tabelle 3 gibt hierzu einige Beispiele an. Als Ausgangsmaterial dient hierbei im allgemeinen das virushaltige Medium der infizierten Zellkultur.

Tabelle 3: Einbau von radioaktiv markierten Nukleosiden bei verschiedenen Virusarten

Virusart	Nukleosid	Literatur
RNS-Viren:		
Aviäres Myeloblastosis-Virus	^{3}H-Uridin	32
Mamma-Tumor-Virus der Maus	^{3}H-Uridin	97
Foamy-Virus	^{3}H-Uridin	100
Visna-Virus	^{3}H-Uridin	49, 75
Virus der Equinen Infektiösen Anämie	^{3}H-Uridin	17
Rous Sarcom-Virus	^{3}H-Uridin	133
Staupe-Virus	^{3}H-Uridin	102
Rinderpest-Virus	^{3}H-Uridin	144
Masern-Virus	^{3}H-Uridin	46
Bovines Respiratorisches Syncytial-Virus	^{3}H-Uridin	59
Pichinde-Virus	^{3}H-Uridin	14
Lactic Dehydrogenase-Virus (in Mäuse-Embryo-Zellkulturen)	^{3}H-Uridin	118
DNS-Viren:		
Varicella-Virus (in Vero-Zellen)	^{3}H-Thymidin	136
Afrikanisches Schweinepest-Virus	^{3}H-Thymidin	53
Felines Panleukopenie-Virus	^{3}H-Thymidin	124
Parvoviren von infizierten Menschlichen Zell-Linien (KBSH, TVX,Lu III)	^{3}H-Thymidin	124

2.1.3 Gezielte Hemmung der Virusvermehrung durch Einsatz von Antimetaboliten

Die Bestimmung des viralen Nukleinsäure-Typs erfolgt auf indirekte Weise dadurch, daß verschiedene Antimetaboliten selektiv die Vemehrung von RNS- bzw. DNS-haltigen Viren verhindern oder einschränken. Diese Wirkung läßt sich im Zellkultursystem leicht dadurch nachweisen, daß die Vermehrungsrate des Virus im behandelten System mit der in unbehandelten Kontrollen verglichen wird. Die Interpretation der Ergebnisse hat jedoch sehr vorsichtig zu erfolgen, seit man die vielfältigen bei der Virusreplikation ablaufenden molekularbiologischen Vorgänge kennt. Zudem setzen die meisten Antimetaboliten nicht nur streng an einem Synthesemechanismus an, sondern beeinflussen eine ganze Reihe enzymatischer oder anderer funktioneller Reaktionen. Außerdem können sie den Ablauf der Virussynthese auch indirekt beeinflussen, nämlich einerseits durch allgemeine Zellschädigung und andererseits durch eventuelle Hemmung der Bildung von Interferon und/oder anderen virushemmenden Substanzen.

Schließlich muß beachtet werden, daß Antimetaboliten auch fähig sind, okkulte oder unterdrückte Virusinfektionen zu aktivieren. Eine Interferenz verschiedener Virusarten kann dann die Ergebnisse bei Antimetabolitenversuchen verfälschen.

2.1.3.1 Halogenierte Nukleoside (z. B. 5-Jod-2-Desoxyuridin)

I. Aufbau und biochemische Wirkung von 5-Jod-2-Desoxyuridin(JUDR)

JUDR ist ein Thymidin-Analog, das in der 5-Position des Pyrimidin-Teils das Halogen Jod substituiert hat. Der Einbau eines Halogens verändert die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften des Nukleosids. Da JUdR an Stelle von Thymidin intrazellulär verwendet wird, verändern sich die entsprechen-

den biochemischen Reaktionen. Für die Virusvermehrung ist dabei von Bedeutung, daß JUdR und seine phosphorylierten Derivate die Wirkung verschiedener an der DNS-Synthese beteiligter Enzyme hemmen. Der Haupteffekt von JUdR auf die intrazelluläre Virusvermehrung liegt im kompetitiven Einbau in die virale DNS mit entsprechenden Konsequenzen (7, 29. 65). 5-Fluordesoxyuridin und 5-Bromdesoxyuridin haben ähnliche Eigenschaften (7, 63, 101, 137).

II. Einfluß von JUdR auf das Virus-Zell-System

JUdR kann in die Vorgänge des Virus-Zell-Systems vielfältig eingreifen. Ob eine Hemmung der Virusvermehrung oder gar eine Steigerung resultiert, hängt ab von Virusart, Zellart, Dosierung und anderen Faktoren.

Die antivirale Aktivität resultiert aus:

- Zellschädigung;
- Hemmung von Enzymen, die an der DNS-Synthese beteiligt sind;
- Einbau in die Virus-DNS.

Die provirale Aktivität findet ihren Ausdruck in:

- Aktivierung der Virusvermehrung
- Induktion endogener Viren;
- Unterdrückung zellulärer Abwehrmechanismen, wie z. B. Interferonsynthese.

Antivirale Aktivität

a) Zellschädigung

JUdR verhindert durch Hemmung der DNS-Replikation die Vermehrung von Gewebekulturzellen bereits in Dosierungen, die für die

Zellen nicht toxisch sind. Nach Entfernen des Antimetaboliten vermehren sich die Zellen normal weiter. BHK_{21}-Zellkulturen (101), AKR-Maus Embryo-Zellen (137), Raja- und NC-37 sowie EB-3-Zellen (77) zeigten bei 100 µg JUdR pro ml Kulturmedium während 24 Stunden keine Zellschädigung. In Hela-Zell-Kulturen waren selbst Dosen von 500 - 2000 µg/ml Medium nicht toxisch für die Zellen (150).

b) Hemmung von Enzymen, die an der DNS-Synthese beteiligt sind

JUdR hemmt reversibel verschiedene Enzyme, die an der Biosynthese von DNS-Thymidin beteiligt sind (Thymidin-Kinase, Thymidylat -Kinase, Nukleosid-Diphosphat-Reduktase, DNS-Polymerasen und Desoxyribonukleasen). Es kommt daher zu einer Beeinträchtigung der DNS-Synthese. Verhindert wird dabei die Vermehrung von Viren, die DNS enthalten oder deren Vermehrung über eine DNS-Zwischenstufe abläuft (7, 29, 65).

c) Einbau in die Virus-DNS

Nach Einbau von JUdR in die virale DNS kommt es zu einer fehlerhaften Transkription der m-RNS an der Virus-Nukleinsäure und dadurch zu vermehrten Irrtümern in der Proteinsynthese. Dies führt zu abnormal aussehenden Viruspartikeln oder überhaupt nicht zum Zusammenbau der gebildeten viralen Komponenten. Für manche Viren ist es nicht möglich, funktionelles Protein zu bilden (64, 65, 90). Neu synthetisierte Virus-Nukleinsäure ist oft nur bruchstückhaft, in geringerer Menge vorhanden und zeigt eine erhöhte Sensibilität gegenüber Röntgen-, Ultraviolett-, und Licht-Strahlen und gegenüber DNase (7, 38, 119, 132). Bei Vaccinia-Virus ist die mit JUdR gebildete DNS in kleine Stücke zerbrochen, bildet Rosetten oder stellt eine ungeordnete, verwickelte Masse dar (90). Weiterhin kommt es zu einer erhöhten Mutationsrate und zur Bildung von Virus, das weniger virulent ist als das Ausgangsvirus (7, 80).

Provirale Aktivität

a) Aktivierung der Virus-Vermehrung

Wird JUdR in die Zell-DNS eingebaut, kann dies zu einer Virus-Aktivierung führen. Dies gilt sowohl für DNS- als auch für RNS-Viren, z. B. Virus der Stomatitis vesicularis (29), Sindbis-Virus (29), Encephalomyelitis -Virus der Maus (150), Vaccinia- (29), C-Typ- (39, 55), Epstein-Barr-Virus (39, 77), murines Cytomegalovirus (104), murines Leukämie-Virus (78, 137), humanes Cytomegalovirus (128), λ -Phagen (39), Adeno- (39) und Rubella-Virus (101). Der Mechanismus der Stimulation ist noch unbekannt (39, 55, 77, 78, 101, 104, 128).

b) Induktion endogener Viren

JUdR fungiert in niedrigerer Konzentration (20 µg/ml) auch als wirksamer Inducer endogener Viren in einer Vielzahl von Systemen, z. B. Leukämie-Virus der Maus (MuLV) in embryonalen AKR-Maus-Zell-Linien; SV40 in SV40-transformierten Zellen; C-Typ-Viren in verschiedenen Vertebraten-Zellkulturen. Für die Virus-Induktion ist der Einbau von JUdR in die Zell-DNS notwendig (137).

c) Unterdrückung zellulärer Abwehrmechanismen; Hemmung der Interferonsynthese

Wird JUdR dem Medium von Zellkulturen zugesetzt, so kann es die Interferon-Synthese und die Bildung anderer Hemmfaktoren unterdrücken (56, 101).

III. Praktische Anwendung von JUdR zur Bestimmung des Virus-Nukleinsäure-Typs

Die übliche Konzentration, in der JUdR eingesetzt wird um die Vermehrung von DNS-Viren zu hemmen, beträgt 100 µg/ml. Die

Vermehrung von RNS-Viren (ausgenommen die, die bei ihrer Replikation einen DNS-Zwischenschritt durchlaufen) wird dadurch und durch höhere Dosen nicht gehemmt (z. B. Mumps-Virus, Virus der Stomatitis vesicularis und Poliomyelitis-Virus) (7, 56, 65, 150). Beachtet werden muß, daß die Wirkung von JUdR reversibel ist, so daß nach Entfernen des Antimetaboliten aus dem Zellkulturmedium die Zellvermehrung wie die Virusvermehrung ungehindert fortgesetzt werden. Rasche und intensive Virusvermehrung kann den hemmenden Effekt von JUdR unter Umständen durchbrechen, was von Untersuchungen mit Adenoviren bekannt ist (29, 50). Einige von JUdR gehemmte Virusarten sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Einige Virusarten, deren Vermehrung durch 5-Jod-2'-Desoxyuridin gehemmt wird.

Virusart	Literatur
Simian 40-Virus	7
Humanes Adenovirus, Serotyp 19	150
Parvo-Virus H-1	124
Porcines Parvo-Virus	124
Parvoviren, isoliert von permanent infizierten menschlichen Zellinien	124
Afrikanisches Schweinepest-Virus	53
IBR-IPV-Virus	45
Herpes simplex-Virus	7, 40, 65
Aujeszky-Virus	7, 119
Varizella Zoster-Virus	7
Vaccinia-Virus	7, 65, 106

2.1.3.2 Actinomycin D (Actinomycin C_1)

I. Aufbau und biochemische Wirkung

Actinomycin D ist ein polypeptidhaltiges Antibiotikum aus Actinomyceten (11, 112, 130). Es lagert sich an doppelsträngige DNS an und hindert diese somit daran, als Matrize für die RNS-Synthese zu dienen. Es besteht aus zwei identischen zyklischen Peptiden, die über ein Phenoxazon-Ringsystem verknüpft sind.Actinomycin D bindet sich selektiv an das Desoxyguanosin der doppelsträngigen DNS, nicht aber an Einstrang-DNS oder RNS, Doppelstrang-RNS oder RNS-DNS-Hybride (130). Die Bindung von Actinomycin D an die DNS ist irreversibel (150). Bei niedrigen intrazellulären Konzentrationen hemmt Actinomycin D die Transkription, ohne die RNS-Replikation merklich zu stören. Auch die zelluläre Proteinsynthese wird von Actinomycin D nicht direkt gehemmt (130).

II. Einfluß auf das Virus-Zell-System

Die Hemmung der Matrizen-Funktion der DNS beeinträchtigt das Virus-Zell-System in verschiedener Weise. Ob ein Virus empfindlich oder resistent gegenüber der Actinomycin D-Wirkung ist oder ob seine Vermehrungsrate gar erhöht wird, hängt ab von Virus-Art und Virus-Stamm, von Zellart, Dosierung und anderen Faktoren. Im allgemeinen werden DNS-Viren in ihrer Vermehrung gehemmt, während RNS-Viren, ausgenommen solche, die eine DNS-Zwischenstufe bei der Replikation besitzen, nicht beeinflußt werden (7, 46).

Die antivirale Aktivität resultiert aus:

- Zellschädigung;
- Hemmung der DNS-Transkription;
- Hemmung der Proteinsynthese.

Eine provirale Aktivität findet ihren Ausdruck in:

- Stimulation der Virusvermehrung;
- Unterdrückung der Interferonsynthese.

Antivirale Aktivität

a) Zellschädigung

Die zelluläre RNS-Synthese wird durch Actinomycin D komplett gehemmt, und zwar die nukleäre wie die cytoplasmatische (67, 76, 111,112). In menschlichen Konjunktiva-Zellen nahm mit anwachsenden Konzentrationen von Actinomycin (0,001 - 20 µg/ml Medium) der Einbau von H^3-Uridin (als Zeichen der RNS-Synthese) proportional ab (96). Niedrige Dosen (0,04 µg/ml - 0,1 µg/ml) bewirken eine Hemmung der Zellteilung (76, 111), höhere Dosen können toxisch sein, abhängig vom jeweiligen Zelltyp und der Einwirkungszeit (38, 111, 138). Actinomycin D ist generell stark toxisch für die Zelle. Die Spanne zwischen toxischer Dosis und minimaler Virus-hemmender Dosis ist sehr gering (150).

b) Hemmung der DNS-Transkription

Actinomycin D wird irreversibel an die virale DNS gebunden und blockiert somit die m-RNS-Transpription und die entsprechenden RNS-Polymerasen (7, 13, 38). Einer der ersten essentiellen Schritte in der Reproduktion von DNS-Viren wird somit verhindert. Es kommt weder zur Bildung viraler DNS noch zur Synthese der DNS-abhängigen RNS (6, 7, 37, 112, 150). Da die Replikation von Retro-Viren über einen DNS-abhängigen Schritt abläuft, wird auch ihre Vermehrung durch Actinomycin D stark gehemmt (138). Die Wirksamkeit von Actinomycin D als Anti-Tumor-Substanz erklärt sich hieraus (112).

c) Hemmung der Proteinsynthese

Actinomycin D hemmt die Proteinsynthese der Zelle sowie der

DNS-Viren. Die funktionelle Konzentration, die z. B. bei Adenovirus 12 bestimmt wurde, beträgt 0,3 µg/ml Medium (72). Die Reduktion der Proteinsynthese erfolgt langsamer als die der DNS-Synthese. Es wird angenommen, daß die Hemmung der Proteinsynthese durch die Blockierung der DNS verursacht wird (72). Nach HALL und TER MEULEN (46) wird bei hohen Actinomycin D-Konzentrationen von 25 µg/ml und höher, bei 1 Stunde Inkubation, auch die Proteinsynthese von RNS-Viren stark eingeschränkt. Zur Zeit ist der genaue Mechanismus dieses zweiten Actinomycin D-Effektes noch nicht bekannt. Beeinträchtigt werden z. B. Masern-Virus (46), Influenza-Virus (132) und Echovirus 12 (69).

Provirale Aktivität

Actinomycin D kann unter bestimmten Bedingungen die Replikation von RNS-Viren stimulieren (50, 74, 129), z. B. Chikungunya-Virus (50), Dengue-Virus (129), Masern-Virus (82), Mengo-Virus (68) und Schweinepest-Virus (25).
Basis hierfür kann sowohl eine direkte Stimulation der Virusvermehrung sein wie auch eine indirekte Unterdrückung von Hemmfaktoren wie Interferon.

a) Stimulation der Virusvermehrung

Actinomycin D steigert in vitro die Translation von messenger-RNS bei Konzentrationen bis zu 5 µg/ml (74). Der Vermehrungszyclus wird verkürzt, wenn den Wirtszellen Actinomycin D vor, während oder sofort nach der Infektion zugegeben wird (50, 74, 129).

b) Unterdrückung der Interferonsynthese

Die Interferonsynthese in Gewebekulturzellen kann durch Zugabe von 1 µg/ml Actinomycin D und weniger zum Nährmedium blockiert werden (12, 50, 94, 96, 122, 155). Der Grund hierfür ist die Hemmung der Messenger-RNS und der Proteinsynthese, die beide für die Interferon-Produktion notwending sind (61).

III. Praktische Anwendung zur Behandlung des Virus-Nukleinsäure-Typs

Die Replikation von DNS-Viren sowie von Retro-Viren wird mit Actinomycin D-Konzentrationen von 0,1 µg/ml und weniger gehemmt. Die Zugabe von Actinomycin D erfolgt vor, während oder unmittelbar nach der Virus-Infektion. Als Einwirkungszeit genügen im allgemeinen eine bis 24 Stunden (6, 7, 9, 37, 50,, 73, 82, 102, 112, 138, 150).

Orthomyxoviren haben einen DNS-Transkriptions-abhängigen Vermehrungsschritt und sind somit Actinomycin D-empfindlich (6, 7, 67, 138). Andere RNS-haltige Virusarten zeigen schwankendes Verhalten gegenüber Actinomycin D. Niedrige Dosen (0,1 µg/ml) können das Wachstum von Poliovirus stimulieren, hemmen oder ohne Einfluß bleiben. Das Ergebnis hängt von der Vorbehandlung der Zellen ab sowie teilweise von der Eigenschaft des Serums, mit welchem sie gezüchtet werden (19, 37, 46).
Die Mehrzahl der RNS-Viren wird nicht in ihrem Wachstum beeinflußt, z. B. Tollwut-Virus (13), Mumps-Virus, Parainfluenza-3-Virus (46, 96), Newcastle Disease-Virus (6, 138), Virus der Stomatitis vesicularis (9), Mengo-Virus (37, 111, 112) und Schweinepest-Virus (25). Arbo-Viren, Rhino-Virus Typ 14, Masern-Virus und MKS-Virus zeigen bei sehr hohen Actinomycin D-Konzentrationen (über 25 µg/ml) eine verminderte Wachstumsrate (37, 38, 46, 129). Im allgemeinen wird ein Virus, dessen Vermehrung bei niedriger Actinomycin D-Konzentration (bis 0,1 µg/ml) nicht beeinträchtigt wird, zu den RNS-Viren gerechnet (7, 82)

Einige von Actinomycin D gehemmte Virusarten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Einige Virusarten, deren Vermehrung durch Actinomycin D gehemmt wird.

Virusart	Literatur
Orthomyxoviren	6, 7, 9, 67, 132
Rous Sarcom-Virus	6, 7, 138
Adenovirus, Serotypen 2, 5, 12	72, 150
Vaccinia-Virus	112

2.1.3.3 Distamycin A

I. Aufbau und biochemische Wirkung

Das Antibiotikum Distamycin A ist ein basisches Oligopeptid mit antiviralen Eigenschaften. Es wird von Streptomyces distallicus produziert (7, 15, 71, 74). Charakterisiert wird es von 3 Resten der 1-Methyl-4-Aminopyrrol-2-Carbol-Säure mit 2 Seitenketten (7, 15). Distamycin A hemmt die Synthese von doppelsträngigen DNS-Molekülen (7, 71), außerdem bindet es sich spezifisch an doppelsträngige DNS, bildet mit ihr einen stabilen Komplex und hemmt auf diese Weise die Matrizen-Aktivität dieser DNS (7, 15, 71, 98). Distamycin A wird als Antimetabolit bei DNS-Viren eingesetzt.

II. Einfluß auf das Virus-Zell-System

Distamycin A wirkt auf das Virus-Zell-System durch seine spezifische DNS-Hemmung. Es kommt dabei bei den verschiedenen Virus- und Zellarten zu unterschiedlichen Reaktionen.

Die antivirale Aktivität resultiert aus:

- Zellschädigung;
- Hemmung der doppelsträngigen DNS-Synthese;
- Hemmung der "Template"-Funktion der DNS;
- Hemmung der reversen Transkriptase.

a) Zellschädigung

Die Distamycin A-Behandlung führt zur Hemmung der Zellteilung, ohne bei den gebräuchlichen Konzentrationen cytotoxisch zu wirken. Die cytostatischen Eigenschaften gelten auch bei Zellen, die mit RNS-Tumorviren infiziert sind (7, 15).

b) Hemmung der Synthese doppelsträngiger (ds) DNS

Distamycin A hemmt selektiv den enzymatischen Schritt, der notwendig ist, ds DNS-Moleküle zu bilden, erlaubt aber die Synthese von RNS-DNS-Hybrid-Molekülen und von einfachsträngigen (ss) DNS-Molekülen (7, 71).

c) Hemmung der "Template"-Funktion der DNS

Durch die Bindung von Distamycin A an ds DNS wird die DNS für die Transkription blockiert (7, 15, 72, 98). Die Wirkung auf die Template-Aktivität der DNS ist abhängig von der Zahl der Pyrrol-Ringe im Distamycin A-Molekül. Derivate mit 5-Pyrrol-Ringen sind wirksamer als solche mit 3-Pyrrol-Ringen (7, 15, 71, 98). Die Transkriptionshemmung der DNS ist wahrscheinlich die Ursache für den spezifischen Effekt von Distamycin A bei der Replikation der DNS-Viren (98).

d) Hemmung der reversen Transkriptase

Distamycin A und einige seiner Derivate hemmen die reverse Transkriptase von Retro-Viren. Der hemmende Effekt ist unvollständig und wird auch mit hohen Distamycin A-Konzentrationen nicht verstärkt (7, 70, 71). In Gegenwart von Distamycin A werden ss DNS und Hybrid-DNS-Moleküle gebildet, nicht aber ds DNS-Spezies. Die provirale DNS-Synthese, die für die Replikation der RNS-Tumor-Viren notwendig ist, wird gehemmt. Hierauf dürften die cytostatischen Eigenschaften von Distamycin A bei experimentellen Tumoren der Maus und Ratte beruhen (7, 15, 70, 71).

III. Praktische Anwendung bei der Bestimmung des Virus-Nukleinsäure-Typs

Distamycin A unterdrückt die Replikation vieler DNS-Viren und

die der RNS-Tumor-Viren in vitro bei Konzentrationen von 100 µg/ml und weniger. Einige von Distamycin A gehemmte Virusarten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Einige Virusarten, deren Vermehrung durch Distamycin A gehemmt wird.

Virusart	Literatur
Aviäres Myeloblastosis-Virus	7
Friend Leukämie-Virus	7
Rous Sarcom-Virus	70, 71
Adenoviren	149
Herpes simplex-Virus	7, 15
Aujeszky-Virus	98
Vaccinia-Virus	7, 15, 98
T_1- und T_2-Phagen	27

2.1.3.4 Mitomycin C

I. Aufbau und biochemische Wirkung

Mitomycin C ist ein Antibiotikum aus Streptomyces caespitosus, ein Indolchinonderivat, das ein Äthyleniminringsystem besitzt (11, 73, 150). Nach Reduktion in der Zelle wird der Äthyleniminring geöffnet, und Mitomycin C erhält alkylierende Eigenschaften. Durch solche Alkylierungsreaktionen können kom-

plementäre DNS-Stränge "vernetzt" und bei der Replikation nicht mehr getrennt werden. Mitomycin C hat antimikrobielle und Antitumor-Eigenschaften (11).

II. Einfluß auf das Virus-Zell-System

Mitomycin C greift in die Vorgänge des Virus-Zell-Systems vielfältig ein. Es kann die Replikation von DNS-Viren in vitro hemmen oder stimulieren. Die jeweilige Wirkung von Mitomycin C ist abhängig von Zell- und Virusart und anderen Faktoren (38, 73, 150).

Die antivirale Aktivität resultiert aus:

- Zellschädigung;
- Hemmung der DNS-Synthese.

Eine provirale Aktivität findet ihren Ausdruck in:

- Induktion und Stimulation von DNS-Viren.

1. Antivirale Aktivität

a) Zellschädigung

Werden Zellen mit Mitomycin C behandelt, so kommt es zu einem veränderten Zell-Wachstum. Während die Protein-Synthese nicht beeinflußt wird, wird die Replikation der zellulären DNS stark reduziert; die Zellteilung wird gestoppt. Mitomycin C soll das zelluläre Genom zerstören (111). Die einzelnen Zellarten sind unterschiedlich empfindlich. 20 µg Mitomycin C pro ml Kulturmedium bei einer Behandlung über 24 Stunden hemmt die Zellvermehrung von Chinese Hamster Kidney-Zellen komplett (73). Höhere Dosen sind toxisch. Bei HeLa-Zellen ist bereits eine Dosis von

10 µg/ml zellzerstörend (150), während wiederum HEp-2-Zellen die 4-fache Dosis vertragen (38).

b) Hemmung der DNS-Synthese

Mitomycin C verhindert die Replikation einiger DNS-Viren in vitro durch eine irreversible Hemmung der DNS-Synthese (150). RNS-Viren bleiben unbeeinflußt, was z. B. für Polio-Virus (38), Tollwut-Virus (38) und Stomatitis-vesicularis-Virus (9) nachgewiesen ist.

2. Provirale Aktivität

Die provirale Aktivität von Mitomycin C in niedrigen Dosen (0,5 - 1 µg/ml während 8 bis 24 h Behandlung) wird vor allem bei solchen DNS-Viren beobachtet, die genetisch in der Zelle integriert sind, ohne daß infektiöses Virus in wesentlicher Quantität gebildet wird. Bekannt ist die Induktion von infektiösem SV40 sowie von Polyma-Virus in transformierten, nicht produktiven Hamsterzellen (91, 109). Die Produktion von infektiösem SV40 wird hier um das 10- bis 100-fache gesteigert. Gleichgültig ist, ob die Zugabe von Mitomycin C vor oder nach der Infektion erfolgt. Es wird angenommen, daß die Stimulation des Virus-Wachstums zellulär bedingt ist. Obwohl die Zellteilung total blockiert ist, können größere Mengen von zellulären Enzymen, die mit dem DNS-Metabolismus in Zusammenhang stehen, in Mitomycin C-behandelten Zellen synthetisiert werden. Da sie von den Zellen nicht gebraucht werden können, stehen sie für die Replikation der viralen DNS zur Verfügung (73).

III. Praktische Anwendung zur Bestimmung des Virus-Nukleinsäure-Typs

Üblicherweise beträgt die Dosis von Mitomycin C 5 µg/ml, wenn die Replikation von DNS-Viren gehemmt werden soll (150). Zur Virus-Induktion werden niedrigere Konzentrationen gebraucht, von 0,5 - 2 µg/ml. Die unterschiedliche Wirkung von Mitomycin C auf die Replikation verschiedener DNS-Viren ist unter Umständen durch den unterschiedlichen Metabolismus bei verschiedenen Zelltypen sowie der einzelnen DNS-Viren zu erklären. Einige von Mitomycin C gehemmte Virusarten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Einige Virusarten, deren Vermehrung durch Mitomycin C gehemmt wird.

Virusart	Literatur
Influenza-Virus	93
Adenovirus Serotyp 19	150

2.1.3.5 Rifamycin und seine Derivate

I. Aufbau und biochemische Wirkung

Rifamycin, das aus Streptomyces mediterrana stammende, und Rifampicin, ein halbsynthetisches Antibiotikum, haben macro-cyclische Ringstruktur (44) und verhindern die Transkription der DNS, aber auf andere Art als Actinomycin D. Rifampicin hemmt spezifisch die Initiierung der RNS-Synthese, indem es die Bindung der ersten Phosphodiesterbrücke der RNS-Kette stört. Die Transkriptase von RNS-Ketten, deren Synthese schon in Gang ist, oder die Bindung der RNS-Polymerasen an die DNS-Matrize wird nicht beeinflußt (130).

II. Einfluß auf das Virus-Zell-System

Rifamycin und seine Derivate werden benutzt, um die virale DNS-abhängige RNS-Polymerase zu hemmen. Es beeinflußt die Replikation von DNS-Viren und der RNS-Tumor-Viren (7, 43, 70, 142, 146, 154). Dabei gibt es große Unterschiede in der Empfindlichkeit der einzelnen Viren wie in der Wirksamkeit der verschiedenen Rifamycin-Derivate (43, 131, 142, 146).

Die antivirale Aktivität resultiert aus:

- Zellschädigung;
- Hemmung von RNS-Polymerasen;
- Hemmung des Virus-Zusammenbaus;
- Hemmung der reversen Transkriptase.

a) Zellschädigung

Die einzelnen Rifamycin-Derivate sind in ihrer zellschädigenden Wirkung unterschiedlich. Rifampicin ist dabei am wenigsten toxisch. Bei den einzelnen Zellarten gibt es hinsichtlich der

Toxicität von Rifampicin große Unterschiede. Allgemein gilt, daß Rifampicin ab 100 oder 150 µg/ml Kulturmedium cytotoxisch wirkt, wobei die durch Tumorviren transformierten Zellen sehr viel empfindlicher sind (141, 146). BHK_{21}-Zellen (131, 141), HEp-2-Zellen (38, 131), KB-Zellen (131), BSC_1-Zellen (131), Mäuse-Embryo-Zellen (131) und menschliche embryonale Lungenzellen (131) beginnen nach 3 - 4 Tagen Inkubation mit 100 - 150 µg/ml Rifampicin degenerative Veränderung zu zeigen. Es kommt zu mitochondrialer Schwellung und zum Auseinanderbrechen der Cristae (141). Die Vermehrungsfähigkeit der Zellen nimmt bei Dosierungen über 10 µg/ml proportional ab. HeLa-Zellen sind etwas resistenter. Sie und BHK_{21}-Zellen wachsen bei 50 µg/ml noch gut, während bei 100 µg/ml keine Vermehrung mehr stattfindet (131). Die Wirkung von Rifampicin bei nicht toxischen Dosen ist reversibel. HeLa- und BHK_{21}-Zellen erholen sich sogar nach einer 3 - 4 Tage dauernden Behandlung mit 100 µg/ml Rifampycin und erhalten ihre Teilungsfähigkeit zurück (131).

b) Hemmung der RNS-Polymerasen

Rifampycin beeinflußt die Replikation von DNS-Viren wie Pocken- und Adenoviren. Es hemmt spezifisch die DNS-abhängigen RNS-Polymerasen, ohne dabei die DNS zu blockieren, wie es bei Actinomycin D der Fall ist. Das Antibiotikum hat keinen Effekt, wenn es erst zugefügt wird, nachdem die DNS-abhängige RNS-Polymerase zu transkribieren begonnen hat (26, 131, 141). Ebenso geht die Hemmwirkung von Rifampicin sofort nach seinem Entfernen aus dem Zellkulturmedium verloren (151).

Es wird angenommen, daß Rifampicin unter bestimmten Bedingungen auch die RNS-abhängige RNS-Transkriptase beeinflussen kann. So hemmt es z. B. Stomatitis-Vesicularis-Virus, Newcastle Disease-Virus (54), die beiden Picorna-Viren Poliovirus und MKS-Virus sowie RNS-Bacteriophagen, z. B. Qß-Phagen (38) in ihrer Replikation. Der Mechanismus scheint aber ein anderer zu sein als bei der Hemmung der DNS-Viren. Wahrschein-

lich stört das Antibiotikum hierbei erst den späten Reifungsprozess (38).

c) Hemmung des viralen Zusammenbaus bei Pockenviren

Es gibt keinen Hinweis, daß die RNS-Polymerase von Vaccinia-Virus durch Rifampicin in seiner Funktion gestört ist. Virale DNS, "frühe" und "späte" messenger RNS und ein Spektrum von frühen und späten Vaccinia-Proteinen werden in Gegenwart von Rifampicin synthetisiert (33, 42, 92). Es wurde jedoch beobachtet, daß die trilaminaren Membranen, Vorläufer der Virushülle, sich in Gegenwart von Rifampicin anhäufen und von irregulärer Kontur sind (42). Rifampicin verhindert letztlich den Zusammenbau von DNS und Proteinen zu reifen Virus-Partikeln (92, 131, 151).

d) Hemmung der reversen Transkriptase

Die reverse Transkriptase der RNS-Tumor-Viren ist verantwortlich für die Synthese von DNS-Ketten an der RNS-Matrize. Im extrazellulären Test hemmt Rifampicin bei hohen Konzentrationen (450 µg/ml Reaktionsmixtur) die Synthese dieser DNS-Moleküle (70). Dabei gibt es große Unterschiede in der Wirksamkeit der verschiedenen Rifamycin-Derivate. Von Bedeutung sind die Substituenten an der 3-Seitenkette des macrocyclischen Rifampicin-Rings (43, 44, 154). Besonders wirksam scheinen N-Demethylrifampicin und 3-(2,4 dinitrophenolhydrazonomethyl)-Rifamycin SV zu sein (7, 44, 54, 146, 154). Die Wirkung gilt auch für das lebende System. Rifampycin-Derivate werden erfolgreich benutzt, um die Transformation von Zellen durch RNS-Tumor-Viren zu verhindern (7, 28, 142).

III. Praktische Anwendung zur Bestimmung des Virus-Nukleinsäure-Typs

Die gebräuchlichste Konzentration von Rifampicin bei der Hemmung von DNS-Viren beträgt 100 - 150 µg/ml (26, 33, 51, 131, 141,142). Auch die oben genannten RNS-Tumor-Viren werden bei diesen Konzentrationen gehemmt (38, 72), während andere RNS-Viren wie Reoviren nicht in ihrer Vermehrung beeinflußt werden. Bei den reverse Transkriptase enthaltenden Viren ist dabei zu beachten, daß nicht alle Rifampicin-Derivate gleiche Wirksamkeit besitzen. N-demethyl-Rifampicin ist einer der effektivsten reverse Transkriptase-Hemmer. Die Wirkung von Rifampicin und seinen Derivaten ist reversibel, was bedeutet, daß die Virus-Synthese sofort nach Entfernen des Antimetaboliten wieder anläuft (38, 151). Einige von Rifampicin gehemmte Virusarten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Einige Virusarten, deren Vermehrung durch Rifampicin gehemmt wird.

Virusart	Literatur
Polio-Virus	38
MKS-Virus	38
Newcastle Disease-Virus	54
Stomatitis Vesicularis-Virus	54
Murines Sarkom-Virus	44
Felines Leukämie-Virus	44
Aviäres Myeloblastosis-Virus	44
Murines Rauscher Leukämie-Virus	154
Mason Pfizer Monkey Tumor-Virus	7
Rous Sarcom-Virus	7, 146
Murines Moloney Sarcom-Virus	54
Adenovirus Serotyp 1	54
Vaccinia-Virus	42,54,92,131,151
Kuhpocken-Virus	151
Q-B Phagen	38

2.1.3.6 1-ß-D-Arabinofuranosyl-Cytosin (D-Arabinosyl-Cytosin, Ara-C)

I. Aufbau und biochemische Wirkung

Ara-C ist ein Pyrimidin-Analog. Es wird durch Zellenzyme zu Mono-, Di- und Triphosphaten phosphoryliert und wirkt dann als kompetitiver Hemmer von DNS-Polymerasen, wobei es mit Desoxycytosintriphosphat (d-CTP) konkurriert. Weiterhin wird Arabinosyl-Cytosin-Triphosphat (Ara-CTP) anstatt Thymidin in die DNS eingebaut und beeinflußt so die Struktur der DNS-Kette (7, 18, 65, 110, 114, 117, 134). Nachgewiesen wurde, daß Ara-C zu einem geringen Teil auch in die RNS eingebaut werden kann. Der Mechanismus ist noch nicht geklärt (18). Inaktiviert wird Ara-C durch zelluläre 2-Desoxycitidin-Deaminase zu Uracil-Arabinosid, einem Metaboliten ohne antivirale Aktivität (114).

II. Einfluß auf das Virus-Zell-System

Ara-C besitzt antiproliferative und antivirale Eigenschaften und hemmt die DNS-Replikation in verschiedenen Organismen (18, 110). Diese Hemmwirkung von Ara-C ist nicht virusspezifisch und betrifft zelluläre und virale DNS-Synthese in gleichem Umfang (65, 114). Das Virus-Zell-System wird durch verschiedene Wirkungsmechanismen von Ara-C beeinflußt, die aber fast alle mit der DNS-Synthese in Zusammenhang stehen (18, 110, 134). Für die Virusforschung von Bedeutung ist, daß fast alle DNS-Viren in ihrer Replikation gehemmt werden, ebenso wie die RNS-Viren, die während ihrer Vermehrung einen DNS-Schritt durchlaufen (7, 18, 65, 114).

Die antivirale Aktivität resultiert aus:

- Hemmung der Zellvermehrung;
- Hemmung der DNS-Polymerasen;

- Einbau in die DNS;
- Einbau in die RNS;
- Hemmung der Proteinsynthese.

a) Hemmung der Zellvermehrung

Ara-C ist nach seiner enzymatischen Phosphorylierung zu Arabinosyl-Nukleosid-Triphosphat für Säugerzellen hochtoxisch. Diese Toxizität scheint mit seiner DNS-Hemmung und seinem möglichen Einbau in die Zell-DNS zusammenzuhängen. Die Ara-C-Behandlung führt zu einer Zellvergrößerung; d. h. die Zellen wachsen, ohne sich zu teilen. Später kommt es zur Zell-Lysis (18, 65, 114). Die Sensibilität der einzelnen Zellarten ist verschieden groß. Der Einbau von markiertem Thymidin in (Hamster)-Zellen wird ab 5 µg/ml verhindert (117). Murine Leukämie-Zellen (L 5178Y) und Mastocytoma-Zellen werden bereits bei 0,25 µg/ml Ara-C im Kulturmedium zu 50 % in ihrer Vermehrung gehemmt (18). Mäuse-Fibrolasten (L-Zellen) (18) und Ratten-Nieren-Zellen (147) sind etwas resistenter, doch nimmt ihre Vitalität mit steigender Konzentration und Behandlungszeit stetig ab (147, 18). HeLa-Zellen überstehen Konzentrationen von 500 µg/ml bei 24 Stunden Behandlung ohne irreversible Schädigungen (150).

b) Hemmung von DNS-Polymerasen

Das Triphosphat-Derivat von Ara-C, Ara-CTP, verhindert die DNS-Synthese, indem es den kompetitiven Gebrauch des korrespondierenden d-CTP bei der DNS-Polymerase-Reaktion hemmt (18, 110, 114, 134). Die Replikation der DNS-Viren wird dadurch verhindert, z. B. bei Pocken-Viren (7, 4, 134), Aujeszky-Virus (7), Herpes simplex-Virus 1 und 2 (7, 35, 65, 134), Cytomegalovirus (7, 145), Herpes-Virus Saimiri (7) und Adenovirus (7, 36, 55, 65, 78, 150).

Ara-CTP hemmt nicht nur die DNS-abhängige, sondern auch die RNS-abhängige DNS-Polymerase (reverse Transkriptase) der RNS-Tumor-Viren. So wird z. B. die Synthese von Desoxycytidin in Rous Sarcom-Virus-infizierten Zellen gehemmt und die Synthese der proviralen DNS, die für die Zelltransformation und Virus-Replikation benötigt wird, verhindert (7). Nachgewiesen wurde, daß die Vermehrung von Rous Sarcom-Virus (7, 18), Rauscher Leukämie-Virus (7) und Mäuse-Sarcom-Virus (147) durch Ara-C gehemmt wird (18, 147).

c) Einbau in die DNS

Ara-CTP wird auch in die DNS eingebaut und beeinflußt die Konfiguration der DNS-Kette. Es wird eine veränderte DNS gebildet, die nicht mehr als Matrize für weitere Synthesen dienen kann. Ara-C wird dabei meist als Endglied in der neugebildeten DNS-Kette gefunden (18, 110, 114, 134).

d) Einbau in die RNS

Es wurde festgestellt, daß Ara-C zu einem geringen Teil auch in niedermolekulare RNS-Ketten eingebaut wird, spezifisch in 2 S bis 7 S RNS. In hohen Dosen kann Ara-C auch die RNS-Synthese unterdrücken. Die molekulare Basis ist noch unklar (18, 65). Unklar ist auch die Beziehung zu der Tatsache, daß die Replikation einiger Rhabdoviren durch Ara-C gehemmt wird (13, 48).

e) Hemmung der Proteinsynthese

Als Ausnahme unter den RNS-Viren, deren Vermehrung von Ara-C unterdrückt wird, zählt das Tollwut-Virus (13, 48). Der genaue Wirkungsmechanismus hierbei ist noch nicht geklärt. Angenommen wird, daß Ara-C die Induktion eines zellulären Proteins für seine Hemmwirkung

bei Tollwut braucht. Ist die m-RNS nämlich blockiert, (z. B. durch Actinomycin D) oder wird die Übersetzung der m-RNA durch Puromycin oder Cycloheximide verhindert, kann keine Hemmung mehr durch Ara-C festgestellt werden (13. 48).

III. Praktische Anwendung zur Bestimmung des Virus-Nukleinsäure-Typs

Ara-C hemmt die Replikation von allen DNS-Viren bis auf wenige Ausnahmen wie z. B. Molluscum-contagiosum-Virus (36) und die der RNS-Tumor-Viren bei Konzentrationen von 10 µg/ml oder weniger bei 24 Stunden Behandlungszeit. Die Zugabe muß vor oder zu Beginn der viralen Synthese erfolgen, da eine Kettenverlängerung durch Ara-C nicht mehr gestoppt wird (7, 13, 36, 48, 65, 114, 134, 147, 150). Die Vermehrung aller anderen RNS-Viren jedoch bleibt sogar bei höheren Ara-C-Konzentrationen unbeeinflußt, Ausnahme ist jedoch Tollwut-Virus (13, 48).

Einige von Ara-C gehemmte Virusarten sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Einige Virusarten, deren Vermehrung durch Arabinosyl-Cytosin gehemmt wird.

Virusart	Literatur
Rous Sarcom-Virus	7, 18
Rauscher Leukämie-Virus	7
Murines Sarcom-Virus	147
Tollwut-Virus	13, 48
Humanes Adenovirus Serotyp 2, 7, 12 und 19	7, 150
Parvo-Virus (H-1-Virus)	124
Herpes simplex-Virus	7
Herpes saimiri-Virus	7
Aujeszky-Virus	7
Cytomegalovirus	7, 145
Vaccinia-Virus	7, 134
Variola-Virus	134
Ectromelie-Virus	7, 18

2.1.3.7 6-Azauracil Ribonukleosid (6-Azauridin)

I. Aufbau und biochemische Wirkung

6-Azauridin (6-Aza) ist als Ribonukleosid mit einem Pyrimidinderivat als Base ein Analog zum Uridin. Es stoppt die RNS-Synthese durch kompetitives Blockieren der Orot-Säure-Decarboxylase. Dabei wird 6-Aza erst nach Umwandlung zu 6-Azauridin-Monophosphat durch die Uridin-Kinase wirksam. 6-Aza verhindert dann die Decarboxylierung von Orot-Säure zu Uridin-Säure. Zelluläre wie virale RNS-Pyrimidin-Synthese wird gehemmt (7, 41, 94, 102, 108).

Die Hemmung kann rückläufig gemacht werden durch Zugabe von Uridin oder Cytidin. Diese können Uridylat über einen von 6-Aza nicht beeinflußbaren Metabolismus bilden, wohingegen Zugabe von Thymidin oder Orot-Säure wirkungslos bleibt (34, 65).

II, Einfluß auf das Virus-Zell-System

6-Aza hemmt in Zellkulturen die Vermehrung einer Vielzahl von RNS- und DNS-Viren, wobei RNS-Viren wesentlich empfindlicher sind (41, 48, 65, 102). Die antivirale Aktivität beruht auf einem Nicht-Bereitstellen von Uridin-Monophosphat für die RNS-Synthese (65). 6-Aza kann ebenso wie manche anderen Antimetaboliten den Infektionstiter einiger Viren erhöhen (94, 143). Die Wirkung von 6-Aza auf das Virus-Zell-System ist abhängig von Dosis, Zeitpunkt und Dauer der Behandlung, von Virus- und Zellart und anderen Faktoren.

Die antivirale Aktivität resultiert aus:

- Hemmung der zellulären RNS-Synthese;
- Hemmung der viralen RNS-Synthese;
- Hemmung der Protein-Synthese;

- Hemmung der viralen DNS-Synthese.

Eine provirale Aktivität findet ihren Ausdruck in:

- Stimulation der Virusvermehrung;
- Hemmung der Interferonsynthese.

Antivirale Aktivität

a) Hemmung der zellulären RNS-Synthese

6-Azauridin ist in den gebräuchlichen Konzentrationen für die Zellen nicht toxisch. Obwohl 6-Aza neben der viralen auch die zelluläre RNS-Synthese verhindert, wird in den meisten Zellkulturen wie z. B. AV-3 (menschliche Amnion-Zell-Linie), L-Zellen und BHK_{21}-Zellen in Gegenwart von 5 µg/ml während 24 Stunden keine Veränderung der Zellmorphologie oder der Vitalität festgestellt. Erst bei Erhöhung der Dosis und der Behandlungszeit auf über das 5-fache treten mikroskopisch erkennbare Veränderungen auf (34, 48, 105).

b) Hemmung der viralen RNS-Synthese

6-Aza hemmt die Replikation einer Reihe von RNS-Viren wie z. B. Masern-Virus (105), Virus der Subakuten Sklerosierenden Panencephalitis (SSPE), LCM- und Dengue-Virus (105, 140), Tollwut-Virus (48), Staupe-Virus, Influenza-A- und B-Virus, Semliki-Forest-Virus (7), Arboviren der Gruppe B (Flaviviren) (41). Der Antimetabolit unterdrückt die RNS-Synthese, indem er die Bildung von Uridin-Monophosphat verhindert (65). Da 6-Aza erst nach Umwandlung zu 6-Azauridin-Monophosphat durch die Uridin-Kinase wirksam wird (94, 108), kann die Zugabe von Zellextrakten mit einem hohen Anteil an Uridin-Kinase die Virus-Hemmung verstärken (108). Der Einbau von 6-Aza in die virale m-RNS oder t-RNS ist nicht wahrscheinlich, wird aber nicht ausgeschlossen (65).

c) Hemmung der Proteinsynthese

In hohen Konzentrationen (3 mg/ml bei 5 Stunden Inkubation) kann 6-Aza auch die Proteinsynthese beeinflussen, jedoch in geringerem Ausmaß als die der RNS-Synthese (152).

d) Hemmung der viralen DNS-Synthese

6-Aza hemmt auch die Replikation einiger DNS-Viren wie z. B. Herpes-simplex-Virus (34), Cytomegalovirus (65) und Vaccinia-Virus (7). Hierzu sind jedoch 100 - 1000-fach höhere Konzentrationen notwendig als zur Hemmung der RNS-Viren. Z. B. sind 10 mg/ml von 6-Aza nötig, um in Herpes-Simplex-Virus infizierten Zellkulturen die Bildung von Riesenzellen und den Aufbau infektiöser Viruspartikel zu unterdrücken (34). Als grundlegenden Mechanismus stellt man sich die Beeinträchtigung der bei der Synthese von DNS-Viren essentiellen RNS vor (34).

Provirale Aktivität

a) Stimulation der Virusvermehrung

Die Vorbehandlung von Zellsuspensionen mit 6-Aza in geringen Konzentrationen (0,4 - 0,8 µg/ml während 4 Tagen) kann die Replikation von verschiedenen tierischen Viren steigern, z. B. Virus der Stomatitis Vesicularis, Pferdearteritis-Virus, Rhinopneumonitis-Virus, Aujeszky-Virus und Myxomatose-Virus, wobei der Grad der Stimulation bei den einzelnen Virusarten unterschiedlich ist. Der Wirkungsmechanismus ist unbekannt. Es wird angenommen, daß durch 6-Aza neben Interferon noch ein anderer Faktor des zellulären Abwehrsystems reduziert wird (143).

b) Hemmung der Interferonsynthese

6-Aza hat im Vergleich zu Actinomycin D eine geringe Anti-Interferon-Aktivität. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß 6-Aza durch Mediumwechsel leicht aus Zellkulturen entfernt werden kann und seine Wirkung damit aufgehoben ist, während die Aktivität von Actinomycin D irreversibel ist (94).

III. Praktische Anwendung zur Bestimmung des Virus-Nukleinsäuretyps

RNS-Viren sind gegenüber der 6-Aza-Wirkung wesentlich empfindlicher als DNS-Viren. Dies wird bei der Nukleinsäure-Bestimmung ausgewertet. Die häufigste Dosierung für 6-Aza ist 5 µg/ml Kulturmedium bei einer Behandlungszeit von 24 Stunden, wobei die Zugabe sofort, während oder unmittelbar nach der Infektion erfolgt. Die Hemmwirkung von 6-Aza ist reversibel, so daß nach Entfernen des Antimetaboliten aus dem Kulturmedium die Virusvermehrung ungehindert fortgesetzt wird (34, 94).

Einige von 6-Azauridin gehemmte Virusarten sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Einige Virusarten, deren Vermehrung durch 6-Azauridin gehemmt wird.

Virusart	Literatur
Influenza A- und B-Virus	7
Masern-Virus	105
SSPE-Virus	140
Staupe-Virus	7, 102
Newcastle Disease-Virus	108, 152
Semliki Forest-Virus	7
Sindbis-Virus	7
Dengue-Virus	41, 105, 140
LCM-Virus	105, 140
Tollwut-Virus	48
Herpes simplex-Virus	7, 41
Cytomegalovirus	65
Vaccinia-Virus	65

2.2 NACHWEIS DER REVERSEN TRANSKRIPTASE

1. Wirkung und Vorkommen der reversen Transkriptase

Die reverse Transkriptase ist eine RNS-abhängige DNS-Polymerase. Diese DNS-Polymerase synthetisiert nach Eindringen des Virus in die Zelle am viralen RNS-Molekül eine DNS, schreibt also die Information des Virusgenoms von RNS nach DNS um. Die neugebildete virale DNS kann ins Wirtszellgenom integrieren. Die Wirtszellen enthalten dann das komplette Virusgenom als sogenanntes Provirus und geben die virale genetische Information bei der Mitose an die Tochterzellen weiter (115, 153).

Das Vorkommen einer reversen Transkriptase wurde zuerst im Rous Sarcom-Virus von TEMIN und MITZUTANI (139) und im Rauscher Leukämie-Virus von BALTIMORE (5) entdeckt. Damit wurde eine lange zuvor bestehende Hypothese (Provirus) experimentell bestätigt. Inzwischen ist die reverse Transkriptase bei vielen anderen RNS-haltigen Virusarten gefunden worden (siehe Tabelle 11). Alle diese Viren haben ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften. Nach dem Kriterium der reversen Transkriptase werden sie in der Familie der Retroviren zusammengefaßt. Alle diese Viren sind fähig, ihr Genom in das Zellgenom zu integrieren. Es kommt in jedem Fall zur Viruspersistenz. Chronische Zellveränderungen wie z.B. Zelltransformation können die Folge sein (100, 153).

Tabelle 11: Nachweis der reversen Transkriptase bei verschiedenen Virusarten

Virusart	Literatur
Mason-Pfizer monkey-Virus	153
Foamy-Virus	153
Visna-Virus	120, 153
Syncytien-bildende Viren (diverse Spezies: Primaten, Rind, Katze, Vogel)	153
Virus der Equinen Infektiösen Anämie	2, 16
Murine Sarcom-Viren	43
Rauscher Leukämie-Virus	5
Rous Sarcom-Virus	5
Murines Leukämie-Virus	142
Aviäre Leukose- und Sarcom-Viren	153
Aviäres Reticuloendotheliosis-Virus	104

2. Nachweis der reversen Transkriptase

Über den Nachweis der reversen Transkriptase lassen sich Retroviren in Zellkulturen oder tierischem Gewebe identifizieren bzw. quantifizieren. Weitere Untersuchungen tragen zur Klärung des Replikationsmechanismus der Retroviren bei.

Für den Nachweis der reversen Transkriptase ist die Tatsache wesentlich, daß das Enzym seine spezifische Aktivität auch außerhalb des Virus-Zell-Systems beibehält. Die durch die reverse Transkriptase vermittelte Bildung einer DNS an RNS kann im Reagenzglas nachgewiesen werden. Da die reverse Transkriptase an die virale Nukleinsäure gebunden ist, ist es notwendig, das Core permeabel zu machen z. B. mit nichtionischen Detergenzien (Nonidet P 40 R, Triton X-100 R, Sterox SL R). Die Aktivität der reversen Transkriptase läßt sich sowohl mit der viralen RNS (endogene Reaktion) als auch mit synthetischen RNS-DNS Hybriden (Primer-Template-Kombinationen) (exogene Reaktion) bestimmen. Der Nachweis der Reaktion wird dadurch ermöglicht, daß einer der zur Reaktion zugegebenen DNS-Bausteine (Triphosphate) radioaktiv markiert ist. Die Reaktion selbst ist gegenüber RNase empfindlich. Andere Faktoren, die beachtet werden müssen, sind folgende:

a) Die reverse Transkriptase braucht für ihre katalysierende Aktivität divalente Kationen, nämlich Mg^{++} oder Mn^{++}, abhängig vom jeweiligen Virustyp.

b) Für eine komplette endogene Reaktion ist die Zugabe aller vier Desoxyribonukleosid-Triphosphate notwendig.

c) Die Reaktion läuft unter physiologischen Bedingungen ab; d. h. in einer 0,01 mol NaCl-Lösung. Der pH-Wert liegt bei 7,5 - 8,3 und das Temperaturoptimum ist je nach Virusart bei 37°C (Säugerviren) oder bei 40°C (aviäre Viren). Die Zugabe von Reduktionsmaterial (z.B. Dithiothreitol) hat sich als vorteilhaft erwiesen.

Die Reaktion läßt sich in vitro hemmen:

a) durch Behandlung mit RNase;

b) durch Zugabe enzymbindender Substanzen: z.B. Rifamycin SV-Derivate, Streptovaricin und andere;

c) durch unvollständige Substratzugabe, z. B. bei der endogenen Reaktion das Nicht-Bereitstellen aller 4 Triphosphate, oder durch die Zugabe von Substratanalogen, z.B. 3'-Didesoxythymidin-Triphosphate;

d) durch Zugabe von Substanzen, die die divalenten Kationen binden, z. B. Thiosemicarbazon;

e) durch Änderung der übrigen für die optimale Reaktion notwendigen Bedingungen.

Die mit Hilfe der reversen Transkriptase ablaufende Vermehrung von Retroviren läßt sich im Zellkultursystem bzw. in vivo durch Zugabe bestimmter Substanzen hemmen. Die wichtigsten sind:

- halogenierte Nukleoside;
- Rifamycin SV-Derivate;
- Arabinosin-Cytosin;
- Actinomycin D;
- Distamycin;
- Ethidium-Bromid.

Mit Actinomycin D, Arabinosin-Cytosin, Distamycin A und halogenierten Nukleosiden wird generell die DNS-Zwischenstufe blokkiert, so daß es nicht zur Virusneubildung kommen kann. Insofern verhalten sich Retroviren bei Studien mit Antimetaboliten - siehe Kapitel 2.1.3 - entsprechend den DNS-Viren (5, 126, 153).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1 Zellkulturen

Die Untersuchungen wurden in Zell-Linien, Primärzellen und Explantat-Zellkulturen durchgeführt. Regelmäßige Zusätze zu allen Zellkulturen waren:
100 I.E. Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml und 1,5 % Phenolrot (in 0,1 %-iger Lösung).

1. Zell-Linien

Im folgenden werden die benutzten Zell-Linien aufgeführt. Gleichzeitig wird das verwendete Kulturmedium angegeben.

BSC_1-Zellen und Earle's Essential Minimal Medium (MEM) mit 5 % fötalem Kälberserum (FKS).

RK_{13}-Zellen und TC Medium 199 (TCM 199) (Fa. Difco) mit 10 % Kälberserum (KS).

PD-Zellen und MEM mit 5 % FKS.

Vero-Zellen und MEM mit 7 % FKS und 0,5 % hydrolisiertes Lact-Albumin (LA).

Die Subkultivierung erfolgte mittels Saline-Trypsin-Versene Lösung (81).

2. Primär-Zellkulturen

Hier kamen fötale Kälberlungenzellen (BEL) zum Einsatz. Ihre Kultivierung erfolgte nach der Trypsierungsmethode von DULBECCO und VOGT (30). Als Erhaltungsmedium diente MEM mit 10 FKS. Zum Teil wurden die Zellen auch in der ersten Subkultur verwendet.

3. Explantat-Zellkultur

Für die Analyse von Borna-Virus-bedingten Kerneinschlüssen mittels Acridin-Orange standen Explantate von Gehirnen Borna-infizierter Kaninchen zur Verfügung. Die intracerebrale Infizierung der Kaninchen mit Borna-Virus, Stamm M 28, sowie die Anlage und Kultivierung entsprach den Angaben von MAYR und DANNER (87).

3.1.2 Virus

Zur Verwendung kamen folgende Virusmaterialien aus der Stammsammlung des Instituts für Med. Mikrobiologie:

B o r n a -Virus, Stamm 28. Dieser von einem Spontanfall beim Pferd isolierte Virusstamm (A. Mayr) lag als Kulturmaterial aus BSC_1-Zellen (23) vor.

P o l i o -Virus, Serotyp 1 (als Zellkulturmaterial aus Vero-Zellen).

P a r a i n f l u e n z a -3-Virus (als Zellkulturmaterial aus BEL-Zellen).

T e s c h e n -Virus, Stamm Konratice (als Zellkulturmaterial aus PD-Zellen).

R e o v i r u s, Serotyp 1 (als Zellkulturmaterial aus Vero-Zellen).

S c h w e i n e p e s t -Virus, Stamm ALD (als Zellkulturmaterial aus SK-Zellen).

Die O s t e o s a r k o m v i r e n OS-2 und OS-5 wurden aus permanent infizierten Zellkulturen der Sammlung der Ges. für Strahlenforschung und Umweltschutz,München, gewonnen. Die Anlage der Kulturen war 1972 bzw. 1974 mit Tumoren infizierter Mäuse vorgenommen worden (31).

H e r p e s -Virus Equi 1, Stamm RAC (als Zellkulturmaterial) aus RK_{13}-Zellen).

B o v i n e s P a r v o- Virus, Stamm Haden (als Zellkulturmaterial aus BEL-Zellen).

V a c c i n i a -Virus, Stamm Elstree (als Zellkulturmaterial aus BSC_1-Zellen).

3.1.3 Antimetaboliten

Actinomycin D (Actinomycin C_1, Dactinomycin)(Fa. Serva, Heidelberg);
5-Jod-2'-desoxyridin (Fa. Serva, Heidelberg);
Cytosin-Arabinosid-Base (1-ß-D-arabinofuranosyl-cytosin) (Fa.Serva, Heidelberg);
Distamycin-A-Hydrochlorid (Fa. Boehringer, Mannheim GmbH);
Mitomycin C (Fa. Boehringer, Mannheim, GmbH);
Rifampicin (Fa. Boehringer, Mannheim, GmbH);
6-Azauridin-Ribosid (Fa. Serva, Heidelberg).

Die Antimetaboliten wurden alle außer Rifampicin in Aqua dest., Rifampicin in Äthanol gelöst, steril filtriert (Millipore Filter, Porendurchmesser 450 nm) und bei -20°C aufbewahrt.

3.1.4 Radioaktiv markierte Nukleoside

(5,6 - ^{3}H)Uridin, 40-50 Ci/mmol. 5 mCi sind in 5 ml sterilem Aqua dest. gelöst. (Fa. New England, Nuclear Chemicals GmbH).
(6-^{3}H) Thymidin, 26.4 Ci/mmol. 5 mCi sind in 5 ml sterilem Aqua dest. gelöst (Fa. Radiochemical Centre Amersham England).

Die Konzentrationen für die markierten Nukleoside wurden in Vorversuchen bestimmt (siehe unter Versuche und Ergebnisse).

3.1.5 Bei der Acridin-Orange-Färbung verwendete Substanzen und Lösungen:

Acridin-Orange (Fa. Merck, Darmstadt).
Carnoy's Flüssigkeit: 60 % Äthylalkohol, 30 % Chloroform, 10 % Eisessigsäure.
Mc Ilvaine's Puffer: Zitronensäure (0,1 mol) und (0,2 mol) $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ gemischt in einem Verhältnis, welches einen ph-Wert von 4,0 ergibt.
Veronal-Puffer: Veronal-Natr. 0,1 mol in Aqua dest. gelöst und mit 0,1 n HC1 auf pH 7,4 eingestellt.

Enzyme:

Papain (Fa. Serva, Heidelberg), 0,02 % in 0,02 mol HCl.
Desoxyribonuklease 1 von bovinem Pankreas (Fa. Serva, Heidelberg) gelöst 0,01 %-ig in 0,025 mol Veronal-Puffer pH 7,4,der 0,03 mol $MgSO_4$ enthält.
Ribonuklease A von bovinem Pankreas (Fa. Serva, Heidelberg), gelöst 0,05 %-ig in PBS (phosphatgepufferter Kochsalzlösung), pH 7,4.

3.1.6 Beim Nachweis der reversen Transkriptase verwendete Substanzen und Lösungen:

Template Primer:

1. Polyadenylsäure x Dodecathymidylsäure, Poly (A) x d $(dT)_{12}$ lyophilisiert mit NaCl, Basenverhältnis 1 : 1 (Fa. Boehringer, Mannheim).

2. Poly-desoxy-adenylsäure x Deca-desoxythymidylsäure, Poly (dA) x d (dT) lyophilisiert mit NaCl, Basenverhältnis 1 : 1 (Fa. Boehringer, Mannheim).

Beide wurden in 0,5 ml sterilem Aqua dest. gelöst, 1 : 20 mit 0,1 mol NaCl verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

Triphosphate:

rATP (0,1 mol) - Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (Fa. Boehringer, Mannheim).
dTTP (40 mmol) - Desoxy-thymidin-5'-triphosphat, Tetranatriumsalz (Fa. Boehringer, Mannheim).
dATP (40 mmol) - Desoxy-adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (Fa. Boehringer, Mannheim).
^{3}H-TTP-(6-^{3}H) Tymidin -5'-triphosphat in 50% Äthanol, 5 mCi/10 ml, spez. Aktivität 20 Ci/mmol, Tetranatriumsalz (Fa. Schwarz/Mann).

Herstellung des markierten Reaktionsgemischs ("Hot Mix")

1ml ^{3}H-TTP wurde mittels einer Vakuumpumpe vom Äthanol getrennt und in 1ml des folgenden Gemisches vorsichtig gelöst:

5 µl	dTTP
25 µl	dATP
10 µl	rATP
960 µl	Aqua bidest.

Lösungen:

Tris-HCl-Puffer (1 mol): Tris-HCl und Tris-Base werden in Aqua dest. gelöst und in einem Verhältnis gemischt, welches einen pH-Wert von 8,3 bei 5°C ergibt.

Triton-X 100: Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol (Fa.Sigma Chemical Company USA).

DL-Dithiothreitol (DTT), Clealands Reagent (Fa. Sigma Chemical Company USA).

Transfer-Ribonucleinsäure (t-RNS) aus Bäckerhefe, lyophilisiert (Fa. Boehringer, Mannheim).

Die genannten Substanzen wurden in Aqua dest. gelöst.

"Lösung 1"

1 mol Tris-Puffer pH 8,3	500 µl	
1 mol KCl	100 µl	
Template Primer (0,05 mg/ml)	400 µl	(bei Lösung 1a: Poly(A)xd(dT)) (bei Lösung 1b: Poly(dA)xd(dT))
Triton X 100 (10 %ig)	20 µl	

3.1.7 Konjugate zur fluoreszenzserologischen Virustitration

Zur Titration von Borna- und Schweinepest-Virus wurden spezifische Antiseren (vom Kaninchen bzw. Schwein) mit FITC (Fa. Serva, Heidelberg) markiert. Die Technik der Markierung richtete sich nach den Angaben von RESSANG und DEN BOER (113).

3.1.8 Virustitration

Borna- und Schweinepest-Virus wurden nach den Angaben von DANNER et al. (23) bzw. Danner und Bachmann (22) titriert, und zwar auf RK_{13}- bzw. PD-Zellkulturen. Nach Züchtung der Zellen auf Deckgläschen in Leigthon-Röhrchen wurden sie nach der Inokulationsmethode mit 0,2 ml Virusmaterial infiziert und nach 6 Tagen (Borna-Virus) bzw. 16 - 20 h (Schweinepest-Virus) fluoreszenzserologisch ausgewertet (Titerangaben in Infektiösen Einheiten (IE) pro ml). Die Titration aller übrigen Virusarten erfolgte in Mikroplatten (Fa. Falcon Div. Becton, Dickinson and Co.), wobei das Ergebnis aufgrund des entstehenden cpE nach KÄRBER und SPEARMAN (62) ausgewertet wurde (Titerangaben in KID_{50}/ml)

3.1.9 Acridin-Orange-Färbung

Die Acridin-Orange-Färbung von intrazellulärem Borna-Virus erfolgte nach MAYOR (83). Explantat-Zellkulturen, in Leighton-Röhrchen auf Deckgläsern gezüchtet, wurden 5 Min. in Carnoy's-Lösung fixiert, anschließend in der fallenden Alkohol-Reihe (80 %, 70 %, 50 %), jeweils mit Zusatz von 0,01 % Acridin-Orange, hydratisiert und danach 8 Minuten in Mc Ilvaine's Puffer (pH 4) mit 0,01 % Acridin-Orange gefärbt. Die Deckgläser wurden kurz mit Puffer gespült, auf Objektträger gebracht und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Für einen Teil der Zellkulturpräparate fand vor der Acridin-Orange-Färbung folgende Enzymverdauung statt:

1. RNase für 30 Min.
2. Papain für 10 Min. und DNase für 30 Min.

Vor der Färbung wurden alle Enzym-behandelten Präparate in Mc Ilvaine's Puffer auf pH 4 gebracht.

3.1.10 Viruszüchtung in Gegenwart von Antimetaboliten

Nach Beimpfen dichter Zellkulturen (in Glasflaschen) mit Virusmaterial in geeigneter Verdünnung blieben die Zellen 2 h zur Virusadsorption bei Zimmertemperatur und 30 Min. zur Viruspenetration bei 37°C im Brutschrank liegen. Danach wurden die Antimetaboliten dem Kulturmedium in verschiedenen Verdünnungen zugegeben, wobei der Zeitpunkt der Zugabe sowie die Dauer der Behandlung bei den einzelnen Versuchen variierten. Beim Auftreten eines deutlichen cpE in der jeweils ohne Zusatz belassenen infizierten Kontrollkultur, bei Borna-Virus am 7. Tag nach der Infektion, erfolgte das Einfrieren der Zellen mit dem Medium bei -20°C. Danach wurde die Infektiosität der einzelnen Zellkulturen quantitativ untersucht.

3.1.11 Zugabe radioaktiv markierter Nukleoside zur Virusvermehrung

3.1.11.1 Markierung

Zellkulturen in Glasflaschen (50 ml Medium) wurden zu verschiedenen Zeiten vor oder nach Virusinfektion mit ^{3}H-Uridin (1µCi/ml) bzw. ^{3}H-Thymidin (1µCi/ml) beschickt. Zur Kontrolle dienten bei jedem Versuch Zellkulturen, die mit Extrakten normaler Zellkulturen scheininfiziert wurden. Beendet wurden die Versuche durch Einfrieren der Zellen bei -20°C mit frischer Earlescher Lösung, nachdem vorher das Medium von der Zellkultur getrennt worden war (Ausnahme: Polio-Virus, wo Medium und Zellfraktion zusammen blieben).

3.1.11.2 Nachweis der eingebauten Radioaktivität

Nach Auftauen der Zellen erfolgte eine Ultraschallbehandlung für 30 Sek. und eine Zentrifugation für 10 Min. bei 3000 rpm. Danach wurde der Oberstand auf einen Caesiumchlorid (CsCl) - Stufengradienten gebracht, bei dem 5 ml CsCl mit einer Dichte von 1,10 g/ml auf 2 ml CsCl mit einer Dichte von 1,30 g/ml geschichtet worden war. Nach 2 h Zentrifugation (35000 rpm, 4°C) im SW 40-Rotor (Beckman, Spinco L2,65B) wurde die Interphase abgezogen und mit Earlescher Lösung auf eine Dichte von 1,12 g/ml eingestellt. Von dieser Präparation dienten 0,5 ml als Ausgangsmaterial für die Dichte-Zentrifugation im CsCl-Stufengradienten von 1,13 1,25 g/ml. Die Zentrifugation beim Polio-Virus-Versuch erfolgte zusätzlich mit einem CsCl-Stufengradienten von 1,24 - 1,48 g/ml. Der Dichtegradient wurde im SW 56-Rotor (Beckman) 20 h bei 30 000 rpm (4°C) zentrifugiert und anschließend nach Anstechen der Röhrchen in etwa 15 Fraktionen geteilt. Nach Halbierung der einzelnen Fraktionen diente die eine Hälfte zur Dichte- und Infektiositätsbestimmung (Dichtebe-

stimmung über Brechungsindex mittels Refraktometer), die restlichen Fraktionshälften wurden mit einem Tropfen t-RNS (1 mg/ml, siehe Kapitel 3.1.6) gemischt und mit 1 ml 20%iger Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Danach wurden die Fraktionen 20 Min. in Eiswasser gestellt und durch Glasfaser-Filterpapier (GF/C, Fa. Whatmann LTD. England) filtriert, die 3-mal mit 5%iger TCA nachgespült wurden. Die Messung der Radioaktivität der getrockneten Filter erfolgte nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (POP POPOP TOLUOL, Rotiszint 11, K. Roth KG., Karlsruhe) im Szintillationszähler (MR 300, Fa. Kontron, Schweiz).

3.1.12 Nachweis der reversen Transkriptase

3.1.12.1 Konzentrierung und Reinigung des Virusmaterials

Retroviren OS-2 und OS-5:

Das Medium von permanent infizierten Zellkulturen diente als Ausgangsmaterial. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 3000 rpm, 4°C, und 10 Min. bei 10 000 rpm, 4°C, wurde der Überstand 90 Min. (25 000 rpm, 4°C) im SW 27 Rotor (Beckmann) durch Sacharose (7 ml einer 25%igen Sacharose-Lösung in Tris-Puffer) pelletiert.

Borna-Virus:

Das Virus-Material wurde 30 Sek. ultrabeschallt (Sonifier S 75 der Branson Instr. INC), anschließend 10 Min. bei 3000 rpm zentrifugiert, und der Überstand in einem Sacharose-Stufengradienten, bei dem 5ml 20%ige Sacharose in Tris-Puffer über 2ml 50%iger Sacharose in Tris-Puffer geschichtet war, durch Zentrifugation im SW 40-Rotor (Beckman) (2 h bei 35000 rpm, 4°C) gereinigt. Die Interphase wurde abgezogen und nochmals durch 20%ige Sacharose in Tris-Puffer 2 h im SW 40-Rotor bei 35000 rpm und 4°C pelletiert.

3.1.12.2 Durchführung des Enzym-Tests

Nach sorgfältigem Ausgießen der Zentrifugenröhrchen wurde das Virussediment mit ca. 100 µl der "Lösung 1a" bzw. "Lösung 1b" gemischt und 30 Min. bis 1 h ins Eiswasser gestellt. Als Anhaltspunkt für die Menge der Retroviren diente die optische Dichte der so gewonnenen Virussuspension. Hierzu wurden 10 µl im Photometer (Fa. Beckman, Mod.12) bei 280 nm und 260 nm gegen eine nicht virushaltige Vergleichlösung gemessen. Bei den Tumorviren OS-2 und OS-5 rechnet man 12 OD einer Virusmenge von 1 mg/ml zu (H. Schetters, persönliche Mitteilungen). Von der gelösten Virussuspension wurden pro Reaktionsansatz 10 µl in ein Kunststoffröhrchen (Nuncröhrchen der Firma Intermed, Dänemark) pipettiert. Zu diesen 10 µl kamen 10 µl einer 0,01 mol Manganchlorid ($MnCl_2$)-Lösung, 10 µl einer 0,2 mol DTT-Lösung, 60 µl Aqua bidest. und zuletzt nach gründlicher Mischung, als Starter der Reaktion, 10 µl der markierten Triphospatlösung. Dieser Vorgang fand im Eiswasser statt. Zur Bestimmung des Nullwertes wurde die Reaktion jeweils eines Ansatzes sofort nach Zugabe des markierten Triphosphates gestoppt, indem 20 µl t-RNS (10 mg/ml) und gleich anschliessend 1 ml 10%ige TCA, die 0,02 % Pyrophosphat enthielt, mit dem Ansatz gemischt wurden. Die anderen Reaktionsansätze wurden für die gewählte Reaktionszeit (5, 10, 15 und 30 Min.) aus dem Eiswasser in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Danach fand die Beendigung der Reaktionen wie oben beschrieben statt. Die säuregefällten Reaktionsgemische blieben 20 Min. im Eiswasser stehen und wurden dann zur Messung der eingebauten Radioaktivität durch Glasfaser-Filterpapier (GF/C, Fa. Whatmann LTD., England) mittels einer Vakuumpumpe filtriert. Die Filterblättchen wurden vorher 2-mal mit 5%iger TCA und nachher 3-mal mit 5%iger TCA sowie 1-mal mit 10%igem Alkohol gespült. Nach Trocknen der Filterblättchen und Lösen in 5ml Szintillationsflüssigkeit erfolgte die Auswertung im Szintillationszähler.

3.2 Versuche und Ergebnisse

3.2.1 Bestimmung des Virus-Nukleinsäure-Typs mittels Acridin-Orange

Die Bestimmung des Nukleinsäure-Typs durch direkte Färbung mittels Acridin-Orange wurde an Borna-Virus-haltigen Gehirnexplantatkulturen vorgenommen. Mittels Immunofluoreszenz war bei den Zellkulturen das Vorliegen größerer Antigenansammlungen im Zellkern (Kerneinschlüsse) verifiziert worden. Die Auswertung der mit Acridin-Orange gefärbten Kulturen im Fluoreszenzmikroskop ergab folgende intrazelluläre Farbverteilung:

Plasma	-	orange-rot
Kernmatrix	-	grün
Nukleoli	-	gelb-orange
Borna-Kerneinschlußkörperchen	-	orange-rot.

Nach Behandlung des Präparats mit Papain und DNase ergab sich dasselbe mikroskopische Bild. RNase-Behandlung jedoch hatte zur Folge, daß die Borna-Einschlüsse nunmehr ungefärbt erschienen. Diese Befunde deuten an, daß in den Borna-Einschlüssen einzelsträngige RNS enthalten ist.

3.2.2 Bestimmung des Nukleinsäure-Typs mit Hilfe von Antimetaboliten

Zur Definierung seines Nukleinsäure-Typs wurde Borna-Virus in Gegenwart verschiedener Antimetaboliten in BSC_1-Zellen gezüchtet. Die vergleichende Titration des produzierten Virus einschließlich der Ergebnisse bei nichtbehandelten Zellkulturen diente als Indikator für den Einfluß der Substanzen auf die Virusvermehrung. Zur Kontrolle liefen entsprechende Versuche mit anderen Virusarten (mit bekanntem Nukleinsäure-Typ) parallel.

Die Konzentration der Antimetaboliten bei derartigen Versuchen wird in der einschlägigen Literatur unterschiedlich angegeben. Grundsätzlich wird diejenige Menge eingesetzt, die den entsprechenden Virus-Replikations-Schritt sicher zu blockieren vermag. Bei JUdR und BUdR wird im allgemeinen eine Konzentration von 100 µg/ml angegeben. Bei Ara-C liegt dieser Wert bei 20 µg , bei 6-Aza bei 5 µg. Diese Konzentrationen sind für die Wirtszellen in den meisten Fällen nicht toxisch. Bei anderen Antimetaboliten sind jedoch die Grenzen zwischen Virus-Vermehrungshemmung und Zellschädigung sehr eng. Dadurch können die Ergebnisse bezüglich Virusvermehrung verfälscht werden. In Vorversuchen wurden daher diejenigen Konzentrationen bestimmt, die den Zellstoffwechsel nicht beeinträchtigen. Als Repräsentanten wurden hierzu BSC_1-Zellen bzw. BEL-Zellen eingesetzt.

3.2.2.1 Bestimmung der Zelltoxizität der Antimetaboliten

Der Nachweis der Toxizität unterschiedlicher Antimetaboliten-Konzentrationen erfolgte auf zweierlei Weise:

1. Nach Zugabe von Antimetaboliten zum Medium dichter Zellkulturröhrchen (BSC_1, BEL) wurde die Zeit bis zum Auftreten mikroskopisch erkennbarer Zellschädigung (cytotoxischer Effekt) bzw. bis zur völligen Zell-Lysis bestimmt.

2. Zur Ermittlung der erhaltenen bzw. verminderten Teilungsfähigkeit der behandelten Kulturzellen wurden die Antimetaboliten in den Konzentrationen der Versuche 2 (3.2.2.2.) und 3.2.2.3 (siehe Tabelle 5) dem Medium dichter Zellkulturen (BSC_1) für 24 h zugegeben. Nach Abgießen des Mediums erfolgte die Ablösung der Zellen mit STV und nach Zentrifugation (5 Min. bei 500 g) und gründlicher Resuspendierung des Zellsediments das Einsäen in Kulturflaschen in einem Teilungsverhältnis von 1 : 2, 1 : 3 und 1 : 5. Die Zeit bis zur Bildung eines dichten Zell-

rasens im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur wurde protokolliert.

Folgende Resultate ergaben sich:

1. Der cytotoxische Effekt (ctE) der Antimetaboliten nahm mit steigenden Konzentrationen grundsätzlich zu. Bei den geprüften Zellarten traten quantitative Unterschiede auf: BEL-Zellen erwiesen sich gegenüber Mitomycin C und Distamycin A als geringgradig und gegenüber Actinomycin D als bedeutend empfindlicher als die BSC_1-Zellen. Bei Rifampicin traten keine Unterschiede zutage. JUdR, Ara C und 6-Aza waren in der zugesetzten, international üblichen Konzentration nicht toxisch für BSC_1 - und BEL-Zellen. Die genauen Angaben sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

2. Die gewählten Antimetaboliten-Konzentrationen hatten dagegen keinen ausgeprägten Einfluß auf die Teilungsfähigkeit von BSC_1-Zellen. Lediglich Actinomycin D und Mitomycin C führten zu einer leichten Reduzierung (siehe Tabelle 13).

3.2.2.2 Hemmung der Virusvermehrung durch Antimetaboliten

Die Wirkung der verschiedenen Antimetaboliten auf die Virusmultiplikation wurde vergleichend in den in Tabelle 14 angegebenen Virus-Zell-Systemen untersucht.

Versuch 1

Für jedes Virus-Zell-System wurden 16 Glasfläschchen angelegt und mit dem entsprechenden Virus infiziert. Dabei wurden jeweils 2 unterschiedliche Viruskonzentrationen gewählt (8 Fläschchen), um eine unterschiedlich rasche Virusvermehrung zu induzieren und dadurch den etwaigen Einfluß zeitlicher Faktoren auf das Versuchsergebnis zu bestimmen. Borna-Virus, das

Tabelle 12: Toxizitätsbestimmung der Antimetaboliten* bei BSC_1- und Kälberlungenzellen (BEL)

Tag nach Zugabe	Konzentration in µg/ml																	
	Rifampicin					Mitomycin C					Distamycin A					Actino.D		
	10	50	100	150	200	0,1	1	2	5	10	1	10	50	100	200	0,1	1	10
1										□					□			△ ■
2							□	□	□	△ □				□	□		□	▲
3				□	△ □		□	□	△ □	△ ■			□	□	△ ■	□	■	
4			□	△ □	△ □	□	△ ■	△ ■	△ ■	▲		□	■	■	△	■		
5			△ □	▲ ■	▲ ■	△ □	△	△				□			△			
6		△ □	▲ ■			△ □	▲	▲				■		△	△		△	
7		△ □				▲ ■							△	△	▲		△	

△ = erkennbare Zellschädigung BSC_1-Zellen, ▲ = völlige Lysis BSC_1-Zellen
□ = erkennbare Zellschädigung BEL-Zellen, ■ = völlige Lysis BEL-Zellen

* JUdR (100 µg/ml), Ara-C (20 µg/ml) und 6-Aza (5 µg/ml) zeigten während der gesamten Beobachtungszeit keinen mikroskopisch sichtbaren c t E.

Tabelle 13: Teilungsfähigkeit behandelter BSC_1-Zellen gegenüber unbehandelter Kontrolle in %.

Teilungsverhältnis der eingesäten Zellen	Antimetaboliten							
	Kontr.	Rif.	Mito.	Dista.	Actino	JUdR	Ara-C	6-Aza
1 : 2	100	100	100	100	100	100	100	100
1 : 3	100	100	100	100	100	100	100	100
1 : 5	100	100	90	100	90	100	100	100

Tabelle 14: Für die Antimetabolitenversuche verwendete Virus-Zell-Systeme

Virus	Zellen
Versuch 1:	
Herpes-Virus	RK_{13}-Zellen
Parvo-Virus	sekundäre Kälberlungenzellen
Reo-Virus	Vero-Zellen
Parainfluenza-3-Virus	sekundäre Kälberlungenzellen
Teschen-Virus	PD-Zellen
Borna-Virus	BSC_1-Zellen
Versuch 2:	
Herpes-Virus	RK_{13}-Zellen
Parvo-Virus	sekundäre Kälberlungenzellen
Vaccinia-Virus	BSC_1-Zellen
Reo-Virus	Vero-Zellen
Parainfluenza-3-Virus	sekundäre Kälberlungenzellen
Teschen-Virus	PD-Zellen
$Polio_1$-Virus	BSC_1-Zellen
Borna-Virus	BSC_1-Zellen

ohnehin eine protrahierte Vermehrungskinetik aufweist (DANNER und MAYR (25), wurde nur in einer Konzentration eingesetzt. Die genauen Infektiositätstiter sind in Tabelle 15 angegeben. Nach Beendigung der Infizierungsphase (siehe "Material und Methoden" wurden die Kulturmedien abgegossen und die Zellkulturen mit neuem, Antimetaboliten enthaltenen Medium beschickt, das bis zur Auswertung auf den Zellen blieb. Die Konzentration der Antimetaboliten gibt die Tabelle 16 wieder. Pro Virus-Zell-Antimetaboliten-System standen somit 2 Kulturfläschchen zur Verfügung (Fläschchen a und b). Die Versuchsbedingungen sind in Tabellen 15 und 16 einzeln aufgeführt.

Versuch 2

Zellkulturen wurden mit den in Tabelle 15 angegebenen Viruskonzentrationen infiziert und nach beendeter Infektionsperiode mit Antimetaboliten-Medium versehen (Konzentrationen siehe Tabelle 16). Nach 24 h erfolgte das Abgießen dieses Mediums. Die Zellen wurden daraufhin gewaschen und bis zur Auswertung mit neuem Kulturmedium ohne Antimetaboliten-Zusatz weitergezüchtet. Über die Versuchsanordnung informiert die Tabelle 15.

Ergebnisse:

Die Multiplikation von Borna-Virus wurde bei Ara-C und 6-Azauridin stark eingeschränkt oder vollkommen verhindert, dagegen bei Actinomycin D und in Versuch 2 auch bei Mitomycin C stimuliert. Die Ergebnisse der Versuche 1 und 2 sind in Abb. 1 dargestellt. Die Vermehrung der RNS-Viren (Reo-, Parainfluenza-3-, Teschen- und Polio-Virus) wurde nur von 6-Azauridin beeinträchtigt, das die Virusausbeute je nach Versuchsansatz bis zu 4 Zehnerpotenzen senkte. DNS-Viren (Rhinopneumonitis-, Rinderparvo-, und Vaccina-Virus) wurden durch die Antimetaboliten JUdR, Actinomycin D und Ara-C deutlich in ihrer Vermehrung gehemmt. Dasselbe gilt für Distamycin A, welches lediglich bei intensiver

Tabelle 15: Übersicht über die Antimetabolitenversuche 1 und 2: Infektiositätstiter der einzelnen Virusarten, Zeitpunkt des Einfrierens und beobachtete toxische Zellschäden.

Virus	Ausgangsmat. Titer/ml KID_{50} bzw. IE	eingefr. am Tag p. inf.	erkennbare Zellschädigung bei:	wegen völliger Zellysis nicht ausgewertet
Versuch 1:				
Herpes	a) $10^{6,1}$	2. Tag	--	--
	b) $10^{4,1}$	2. Tag	--	--
Parvo	a) $10^{6,1}$	3. Tag	Rifampicin,Mitomycin C	Actinomycin D
	b) $10^{4,1}$	5. Tag	Rifampicin,Mitomycin C	Actinomycin D
Reo	a) $10^{5,8}$	5. Tag	Rifampicin,Actinomycin D	--
	b) $10^{3,8}$	7. Tag	Rifampicin,Actinomycin D	--
PJ-3	a) $10^{8.1}$	5. Tag	Mitomycin C,Rifampicin	Actinomycin D
	b) $10^{6,1}$	5. Tag	Rifampicin,Mitomycin C	Actinomycin D
Teschen	a) $10^{7,1}$	2. Tag	Actinomycin D	--
	b) $10^{5,1}$	4. Tag	Actinomycin D	--
Borna	$10^{4,4}$	7. Tag	Arabinosin-Cytosin,JUdR	Rifampicin
Versuch 2:				
Herpes	$10^{4,1}$	4. Tag	Ara C, Actinomycin D	--
Parvo	$10^{6,1}$	3. Tag	Mitomycin C,Actinom.D	--
Vaccinia	$10^{3.6}$	3. Tag	--	--
Reo	$10^{5,8}$	5. Tag	Rifamp.,Actinom.D,Mitom.C	--
PJ-3	$10^{5,1}$	4. Tag	--	Actinomycin D
Teschen	$10^{6,1}$	4. Tag	Actinomycin D	--
Polio 1	$10^{3,6}$	2. Tag	--	--
Borna	$10^{4,4}$	7. Tag	Distam.A.,AraC,JUdR	--

Tabelle 16: Konzentration der verwendeten Antimetaboliten (µg/ml Medium)

Antimetaboliten	Konz. bei Versuch 1 (siehe 3.2.3)	Konz. bei Versuch 2 (siehe 3.2.3) und bei 3.2.4
Distamycin A	50	100
Mitomycin C	0,1	5
JUdR	100	100
Actinomycin D	0,1	1
Ara-C	20	20
Rifampicin	100	100
6-Aza	5	5

Abb. 1 a Virusvermehrung in Gegenwart von Antimetaboliten

a = Versuch 1, hoher Ausgangstiter
b = Versuch 1, niedriger Ausgangstiter
c = Versuch 2

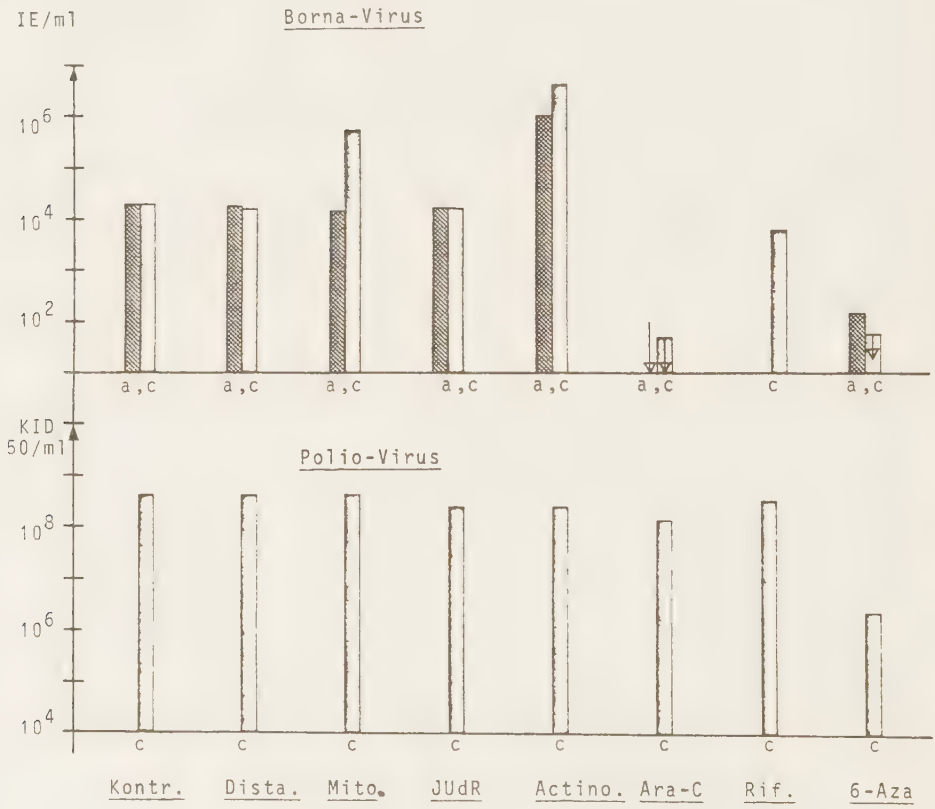


Abb. 1b Virusvermehrung in Gegenwart von Antimetaboliten

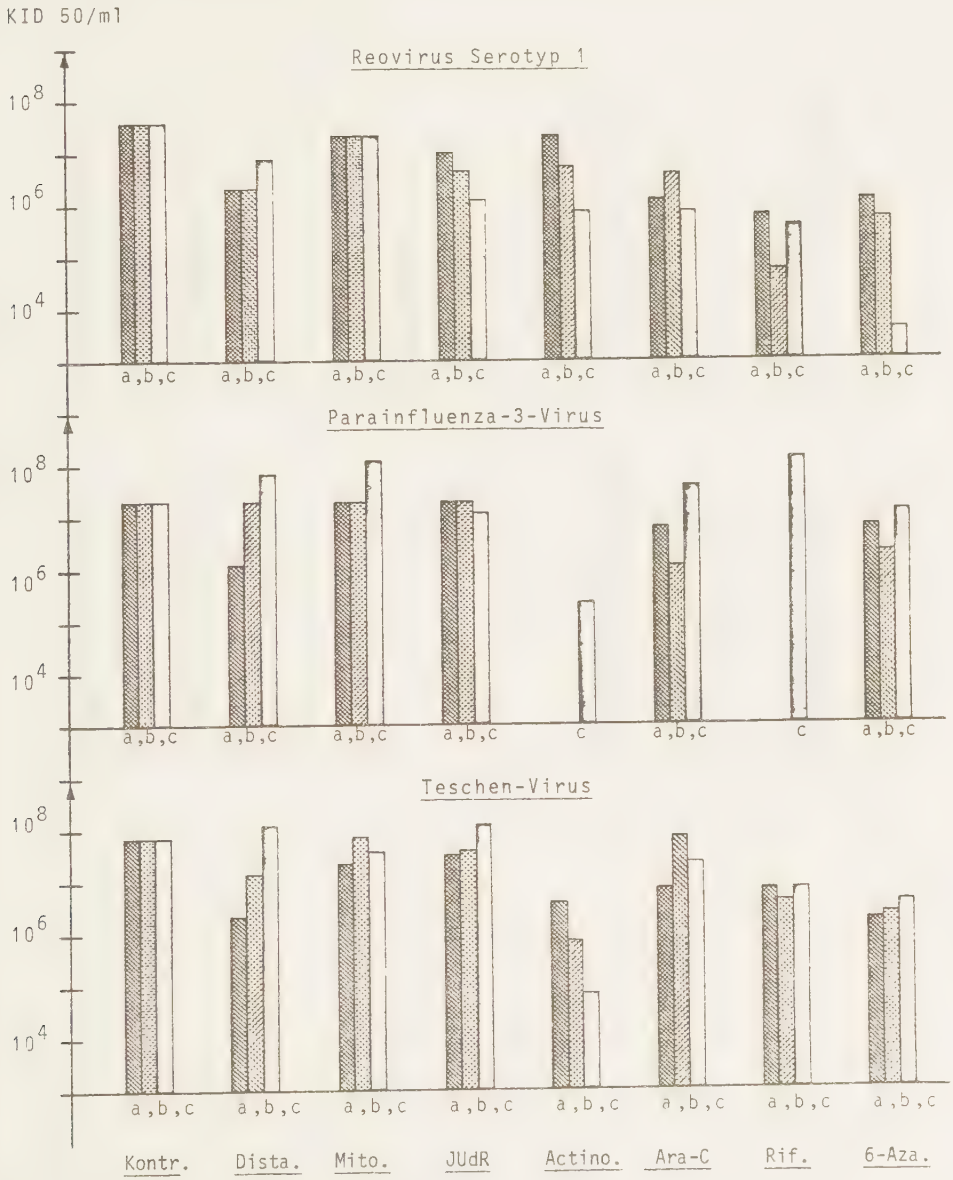
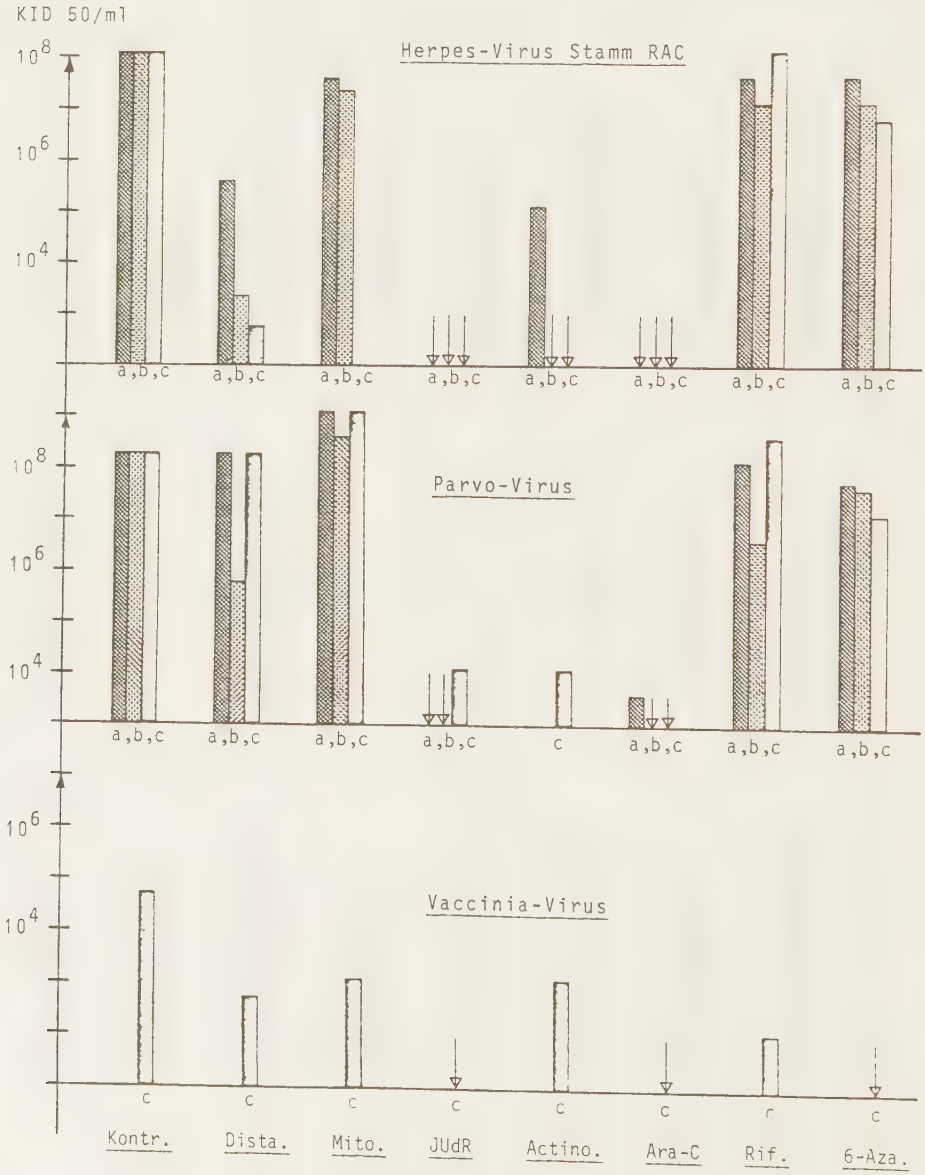


Abb. 1c Virusvermehrung in Gegenwart von Antimetaboliten



Parvo-Virus-Infektion ohne Einfluß blieb. Mitomycin C, Rifampicin und 6-Azauridin reduzierten die Vermehrung der DNS-Viren außer Vaccinia-Virus nicht erheblich.

3.2.2.3 Abhängigkeit der Vermehrungshemmung bzw. -steigerung bei Borna-Virus vom Zeitpunkt des Antimetaboliten-Zusatzes

In den vorangegangenen Versuchen lief die Virusvermehrung entweder völlig unter Einfluß der Antimetaboliten ab (Versuch 1) oder während der ersten 24 h nach Infizierung (Versuch 2). Diese letztgenannte Periode schließt bei allen zum Vergleich eingesetzten Virusarten die entscheidende Replikationsphase ein. Bei Borna-Virus ist die Replikation verzögert und in ihrem Ablauf unbekannt. Durch Zugabe der Antimetaboliten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infizierung sollte diejenige Phase definiert werden, in der die wesentlichen Vermehrungsschritte ablaufen. Gleichzeitig diente dieser Versuch dazu, etwaige durch Antimetaboliten beeinflußbare zelluläre Vorgänge zu bestimmen (Zugabe vor Infizierung), die den Ablauf der Virusvermehrung verändern können. Die Antimetaboliten (Konzentrationen siehe Tabelle 16) wurden dichten BSC_1-Zellkulturen 1 Tag vor bzw. gleichzeitig mit Infizierung sowie 1, 3 und 5 Tage nach Infizierung mit Borna-Virus (1 ml Virussuspension mit dem Infektiositätstiter von $10^{4,4}$ IE/ml) zugegeben und jeweils 24 h im Medium belassen.

Ergebnis:

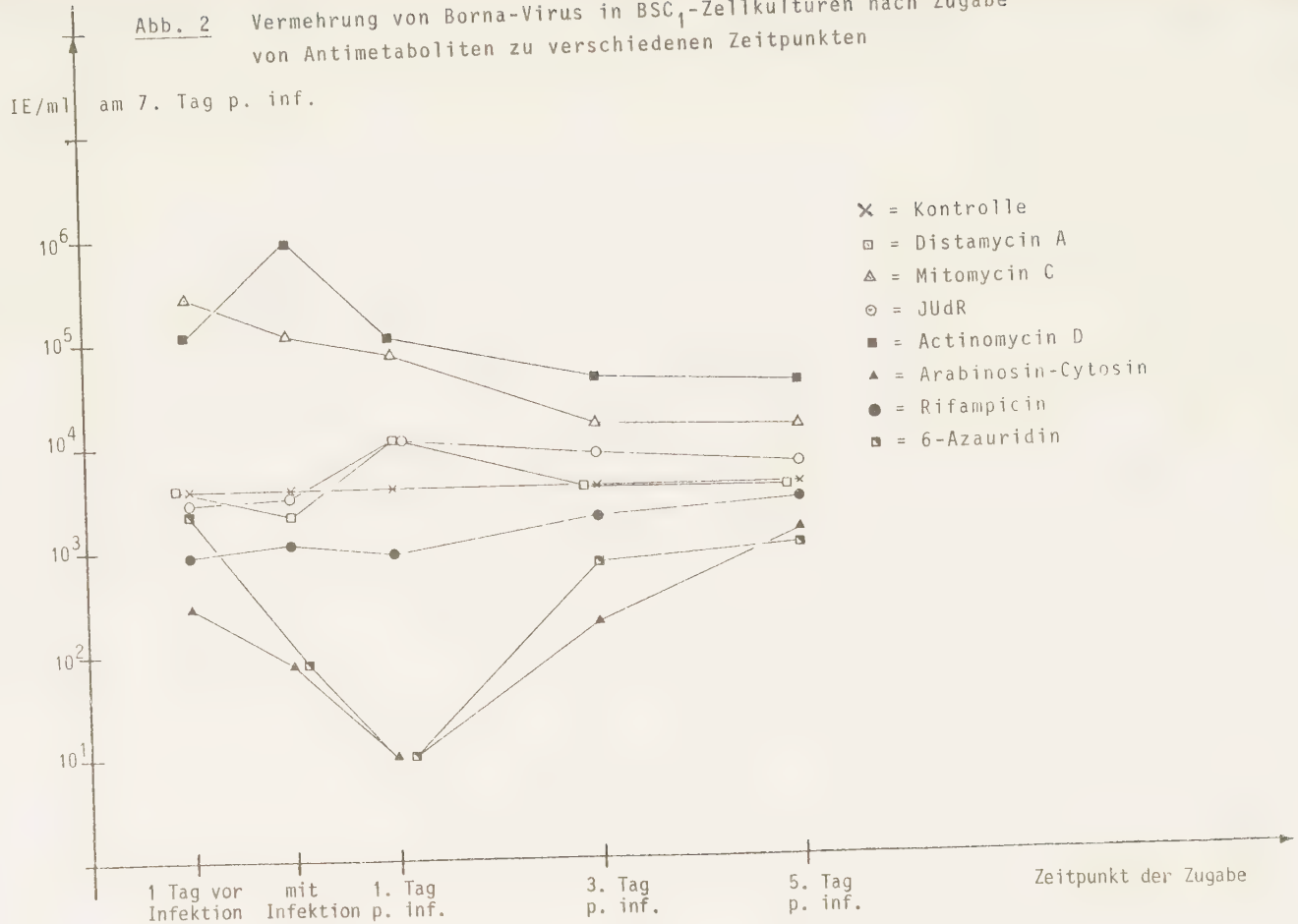
Die stärkste Hemmung der Borna-Virusvermehrung wurde beobachtet, wenn die Antimetaboliten Ara-C und 6-Aza einen Tag nach der Infektion zugegeben wurden. Relativ deutlich war dieser Effekt auch bei Zugabe gleichzeitig mit der Infektion oder am 3. Tag p. inf. Durch andere Antimetaboliten wurde die Virusvermehrung nicht gestört, unabhängig vom Zeitpunkt ihres Einwirkens. Eine geringgradige Hemmung in Rifampicin-behan-

delten Kulturen ging mit dem Auftreten eines leichten cytotoxischen Effektes einher. Wie in den vorherigen Versuchen ließ sich die Virusausbeute steigern, wenn den Zellkulturen Actinomycin D bzw. Mitomycin C zugesetzt worden war. Bei Actinomycin D war eine Stimulierung dann am deutlichsten, wenn es gleichzeitig mit dem Virus in die Zellkultur gebracht wurde. Mitomycin C zeigte die größte Wirkung bei Zusatz am 1. Tag vor der Infizierung. Eine mäßige Steigerung der Virusvermehrung bewirkten auch JUdR und Distamycin A, besonders wenn sie den Zellen gleichzeitig mit dem Virus zugegeben wurden. Abb. 2 stellt die Ergebnisse im einzelnen dar.

3.2.2.4 Einfluß höherer Actinomycin D-Konzentrationen auf die Vermehrung von Borna-Virus

In den vorangegangenen Untersuchungen ist Actinomycin D in virusinfizierten Zellkulturen in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt worden. Diese Menge ergab sich aus der Prüfung der Cytotoxizität unter den gegebenen Versuchsbedingungen. Die Vermehrung von Borna-Virus war dadurch nicht gehemmt, sondern sogar noch gefördert worden. Nach REICH (112) kann man jedoch nur von einer Umempfindlichkeit gegenüber Actinomycin D sprechen, wenn das betreffende Virus selbst in Gegenwart von 2,0 µg/ml nicht in seiner Vermehrung gehemmt wird. NORTHROP (96) und HALL und TER MEULEN (46) benutzten sogar 10 µg/ml bis 50 µg/ml. Im folgenden Versuch kam Actinomycin D daher in höheren Konzentrationen zum Einsatz (10, 20 und 30 µg/ml). Da Actinomycin D in derart hohen Konzentrationen stark toxisch wirkt, wurde die Zugabe zu den infizierten Zellen auf 1 h begrenzt. Zeitpunkt der Zugabe war 24 h p. inf.; ansonsten gelten dieselben Versuchsbedingungen wie in Versuch 3.2.2.3.

Abb. 2 Vermehrung von Borna-Virus in BSC_1-Zellkulturen nach Zugabe von Antimetaboliten zu verschiedenen Zeitpunkten



Ergebnis:

Der Versuch zeigte, daß unter den gegebenen Bedingungen auch hohe Actinomycin D-Konzentrationen die Borna-Virus-Vermehrung nicht hemmten, sondern sogar noch stimulierten. Abb. 3 demonstriert diesen Befund.

Abb. 3 Vermehrung von Borna-Virus in Gegenwart von Actinomycin D in erhöhten Konzentrationen

3.2.3 Bestimmung des Nukleinsäure-Typs über den Einbau radioaktiver markierter Nukleoside

Als sichere Methode zur Bestimmung des Nukleinsäure-Typs von Virusarten gilt der Nachweis des bei der Virussynthese eingebauten Nukleosids (Uridin bei RNS, Thymidin bei DNS). Der Test basiert auf dem Angebot radioaktiver markierter Nukleoside und deren nachträglichem Nachweis in der Virusfraktion. In Präparationen aus nicht infizierten Zellen fehlt dann diese Radioaktivität. Im allgemeinen dient virushaltiges Zellkulturmedium für entsprechende Auswertungen. Die Verwendung von Zellfraktionen ist in der Literatur nicht beschrieben worden (siehe Literaturteil Nr. 2.1.2).

Infektiöses Borna-Virus tritt jedoch im Medium infizierter und produzierender Zellkulturen nicht auf (23). Versuche mit radioaktiv markierten Nukleosiden mußten daher mit der Zellfraktion der Kultur durchgeführt werden. Als Kontrollen dienten entsprechende Versuche mit Viren mit bekanntem Nukleinsäure-Typ. Gewählt wurde hierfür zunächst das Schweinepest-Virus, welches wie Borna-Virus nicht lytisch auf das vermehrende Zellsystem wirkt und zudem in CsCl eine ähnliche Dichte wie Borna-Virus aufweist (58). Auch bei Schweinepest-Virus kam nur die Zellfraktion zur Auswertung. Als zweite Kontrolle diente Polio-Virus, welches zur totalen Zellzerstörung führt und außerdem eine wesentlich höhere Dichte in CsCl hat als Borna-Virus.

In einem Versuch sollte zunächst festgestellt werden, welche Mengen an radioaktiv markierten Nukleosiden Zellkulturen zugeführt werden müssen, damit die aus Kontrollzellen gewonnene Radioaktivität möglichst niedrig gehalten wird.

3.2.3.1 Vorversuch

Die verwendeten Zellen waren BSC_1-Zellen in Vierkantglasflaschen; als markiertes Nukleosid diente ^{3}H-Uridin. Den Medien dichter Zellkulturen wurde das markierte Uridin in jeweils einer der folgenden Konzentrationen zugegeben: 0,5, 1, 5, 10 und 20 µCi/ml Medium. Nach 3 Tagen Inkubation erfolgte das Abgießen der Medien, eine weitere Bebrütung der Zellen mit unmarkierten Kulturmedien für 2 Tage und danach das Einfrieren der Zellen mit frischer Earlescher Lösung bei - 20°C. Diese Zellpräparationen wurden, wie in Kap. 3.1.12 beschrieben, mittels Dichtegradient aufgearbeitet, die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde bestimmt und aufgezeichnet.

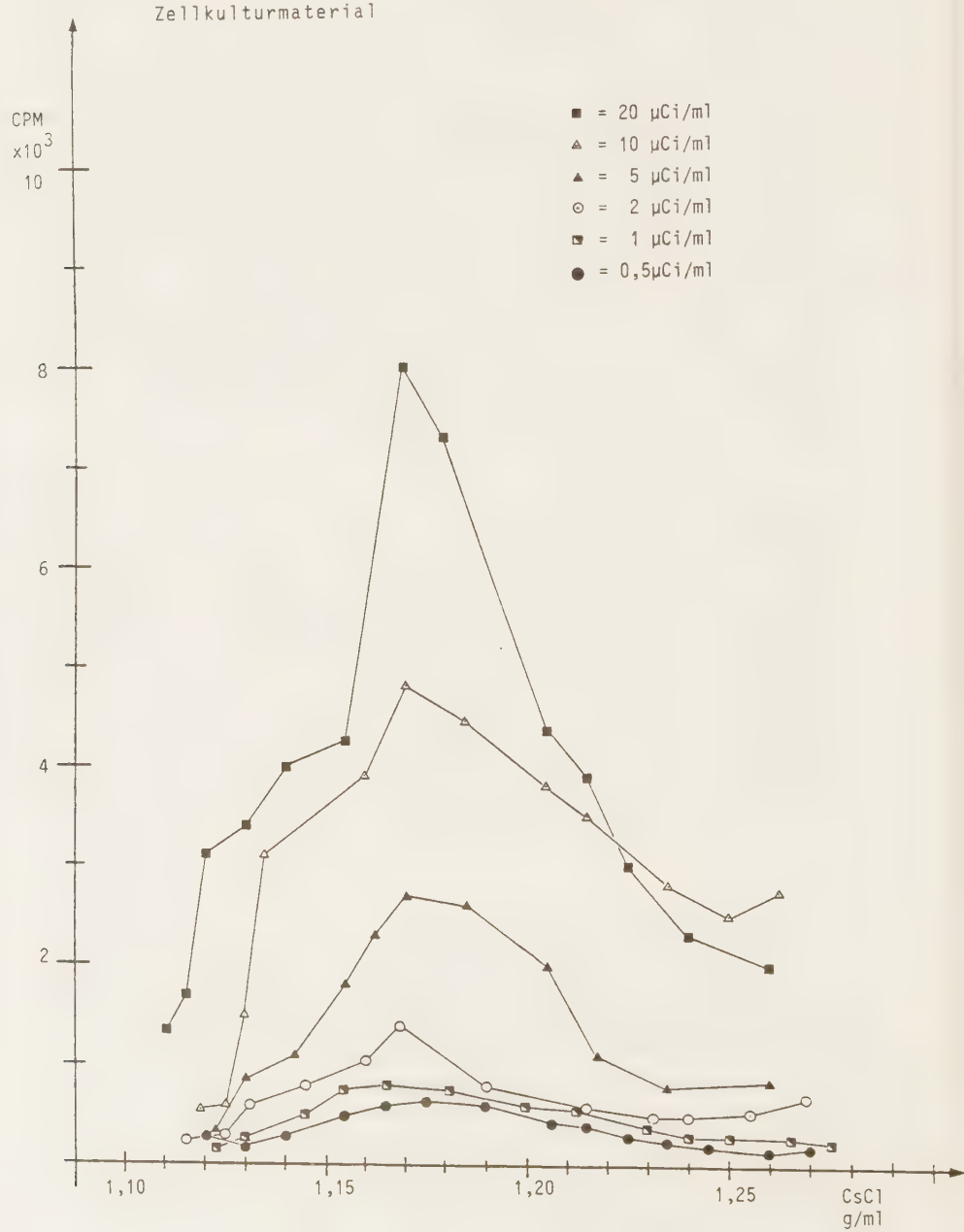
Ergebnis

Unabhängig von der zugesetzten ^{3}H-Uridin-Menge erschienen in allen Präparationen Radioaktivitätsgipfel in den selben Dichtefraktionen (Maximum bei ca. 1.17 g/ml). Die Stärke der Radioaktivität hing indessen von der Quantität des zugefügten ^{3}H-Uridins ab. Die Abb. 4 demonstriert diese Verhältnisse. Für die weiteren Versuche wurde 1µCi/ml verwendet, da diese Konzentrationen nur zu geringer Radioaktivität im entsprechenden Dichtebereich führten.

3.2.3.2 Hauptversuch

Der Versuch der Nukleinsäurebestimmung von Borna-Virus wurde parallel in BSC_1- und in RK_{13}-Zellen durchgeführt. Es wurden jeweils 4 Zellkulturflaschen angelegt (50 ml Medium), davon je 2 mit Borna-Virus infiziert und die 2 anderen mit normalem Zellextrakt behandelt (Scheininfektion). Grundsätzlich folgte der Infizierung ein Mediumwechsel nach ca. 20 h. Die Zugabe von ^{3}H-Uridin bzw. ^{3}H-Thymidin zu je einer infizierten Kultur und scheininfizierten Kontrollkultur erfolgte

Abb. 4 Einbau von ^{3}H-Uridin in nicht infizierten BSC_1-Zellkulturmaterial



zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor bzw. nach der Infizierung. Ebenso variierte die Zeitdauer, in der die Kulturen mit den markierten Nukleosiden inkubiert wurden. Die genauen Versuchsbedingungen enthält die Tabelle 17. Am Ende der Versuche wurden die Zellkulturen mit frischer Earlescher Lösung eingefroren und,wie in Kap. 3.1.12 beschrieben,weiter analysiert.

In entsprechender Weise, allerdings nur mit Verwendung von ^{3}H-Uridin,wurde mit Schweinepest-Virus- bzw. Polio-Virus-infizierten Zellen verfahren. Die hier gültigen Bedingungen enthält ebenfalls die Tabelle 17. Bei den Versuchen mit Polio-Virus bestand ein Unterschied zum oben beschriebenen Verfahren insofern, als die lysierten Kulturen mit dem ursprünglichen Medium eingefroren wurden.

Ergebnis:

1. Borna Virus:

^{3}H-Thymidin - behandelte Zellkulturen (RK_{13} wie auch BSC_1-Zellen), gleichgültig ob Virus-infiziert oder nicht, wiesen nach Analyse im Dichtegradienten nur eine geringfügige Radioaktivität in verschiedenen Dichtefraktionen auf (unter 300 cpm). ^{3}H-Uridin-behandelte Zellkulturen enthielten Radioaktivität, die sich wie in den Vorversuchen zu einem Peak mit Maximum bei einer Dichte von ca. 1,17 g/ml formte. Dieses Bild entstand unabhängig von der verwendeten Zellart (BSC_1- bzw. RK_{13}-Zellen), unabhängig von Zeitpunkt und Dauer der Nukleosid-Zugabe und gleichgültig davon, ob die Zellkulturen mit Borna-Virus infiziert waren oder nicht. Die Ergebnisse eines typischen Versuchs sind in der Abb. 5 dargestellt. Abb. 5 enthält auch das Resultat der Infektiositätsbestimmung der einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten. Hier zeigte sich ebenfalls ein Maximum bei der Dichte von 1.15 - 1.18 g/ml. Ein deutlicher Unterschied zwischen Borna-infizierten und scheininfizierten BSC_1-Zellen ließ sich nur

Tabelle 17: Versuchsbedingungen zur Bestimmung des Nukleinsäure-Typs über den Einbau radioaktiv markierter Nukleoside

Virus	Ausgangs-menge	Zellen	Zeitpunkt der Zugabe	Dauer der Markierung	Dauer der Kultivierung	Status der Zellen
Borna-V.	$10^{7,2}$	BSC_1	4 h vor inf.	8 Tage	10 Tage	100% intakt
			mit Inf.	10 Tage		
			2 Tage p. inf.	8 Tage		
			2 Tage p. inf.	4 Tage		
			4 Tage p. inf.	4 Tage		
Borna-V.	$10^{7,2}$	RK_{13}	4 h vor Inf.	8 Tage	10 Tage	100% intakt
			2 h vor Inf.			
Schweine-pest-V.	$10^{7,1}$	PD	4 h vor Inf.	4 Tage	4 Tage	100% intakt
Polio-V.	10^5	BSC_1	4 h vor Inf.	2 Tage	2 Tage	80% Lysis

in einem Experiment beobachten (Zugabe von ^{3}H-Uridin 2 Tage p. inf., Dauer der Einwirkung 4 Tage), jedoch nicht reproduzieren. Das Ergebnis ist in der Abb. 6 dargestellt.

2. Schweinepest-Virus

Die Ergebnisse entsprachen den mit Borna-Virus erzielten. Sowohl bei den infizierten als auch bei den scheininfizierten Zellen trat Radioaktivität in gleicher Quantität auf und zwar maximal bei einer Dichte von 1.18 g/ml, bei der auch das Maximum der Infektiosität lag (Abb. 7).

3. Polio-Virus

Auch bei der Präparation Polio-Virus-infizierter Zellkulturen bzw. der entsprechenden Kontrollen trat erhöhte Radioaktivität im Dichtebereich zwischen 1.15 und 1.20 g/ml auf wie bei den oben genannten Systemen, ohne daß Unterschiede zwischen infizierten Kulturen und Kontrollkulturen sichtbar waren. Ein deutlicher Anstieg der Radioaktivität fand sich dagegen bei den virusinfizierten Zellkulturen bei einer Dichte von ca. 1.32 bis 1.36 g/ml mit Maximum bei 1.34 g/ml. Die Kontrollpräparation wies hier keine erhöhte Radioaktivität auf. Die Infektiosität hatte ihr Maximum ebenfalls zwischen 1.32 und 1.36 g/ml. Ein kleiner Peak trat bei 1.43 - 1.45 g/ml auf; er war nicht von einem Ansteigen der Radioaktivität begleitet. Die Ergebnisse veranschaulicht die Abb. 8.

Abb. 5 Borna-Virus in BSC_1-Zellen:
Einbau von ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Thymidin und Infektiosität

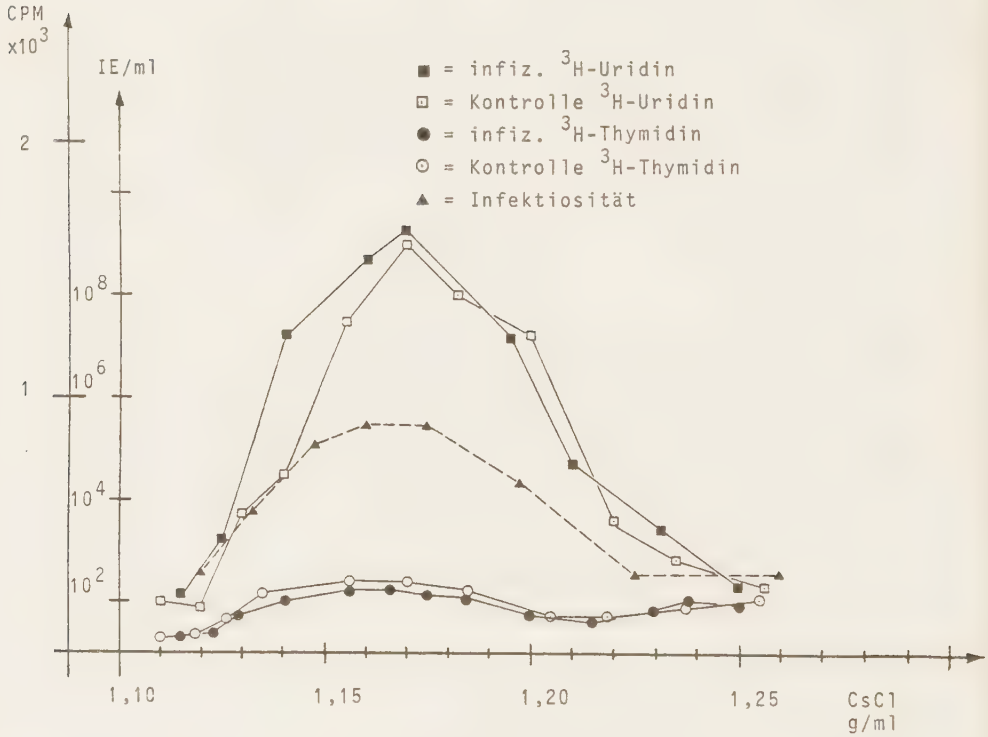


Abb. 6 Borna-Virus in BSC_1-Zellen: Einbau von ^3H-Uridin

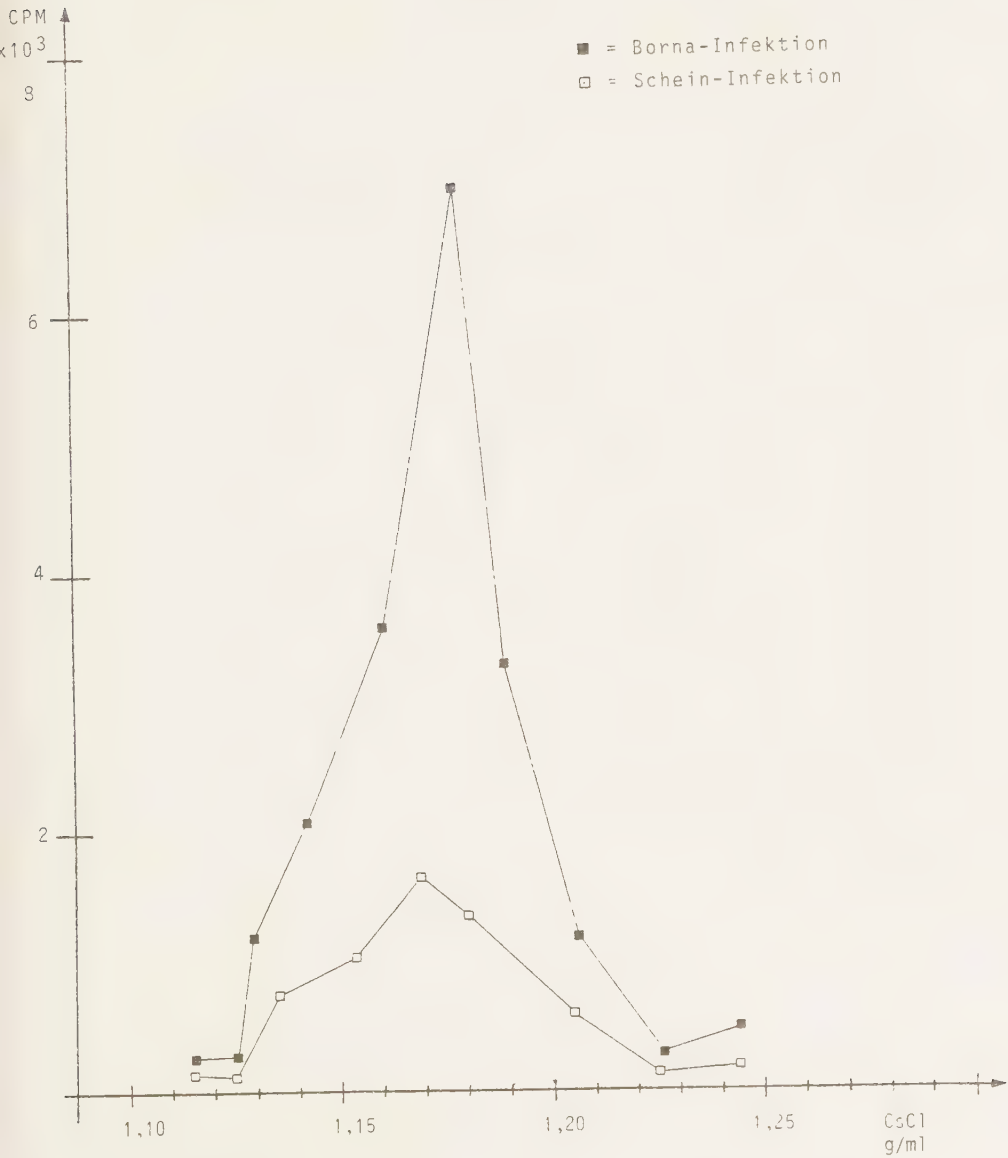


Abb. 7 Schweinepest-Virus in PD-Zellen:
Einbau von ^{3}H-Uridin und Infektiosität

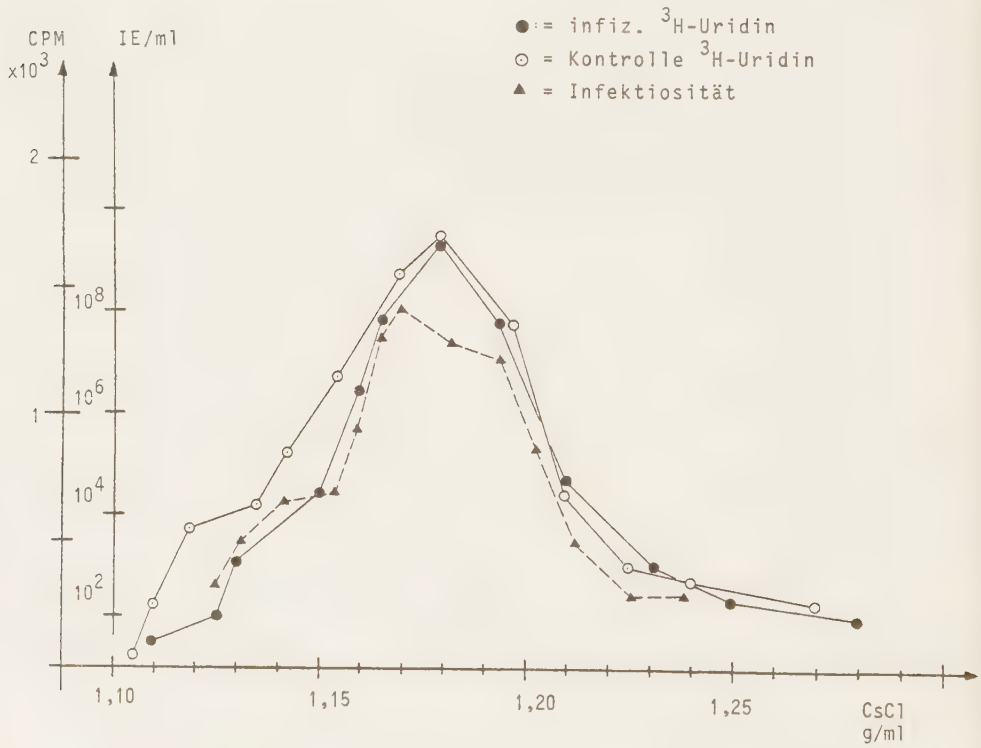
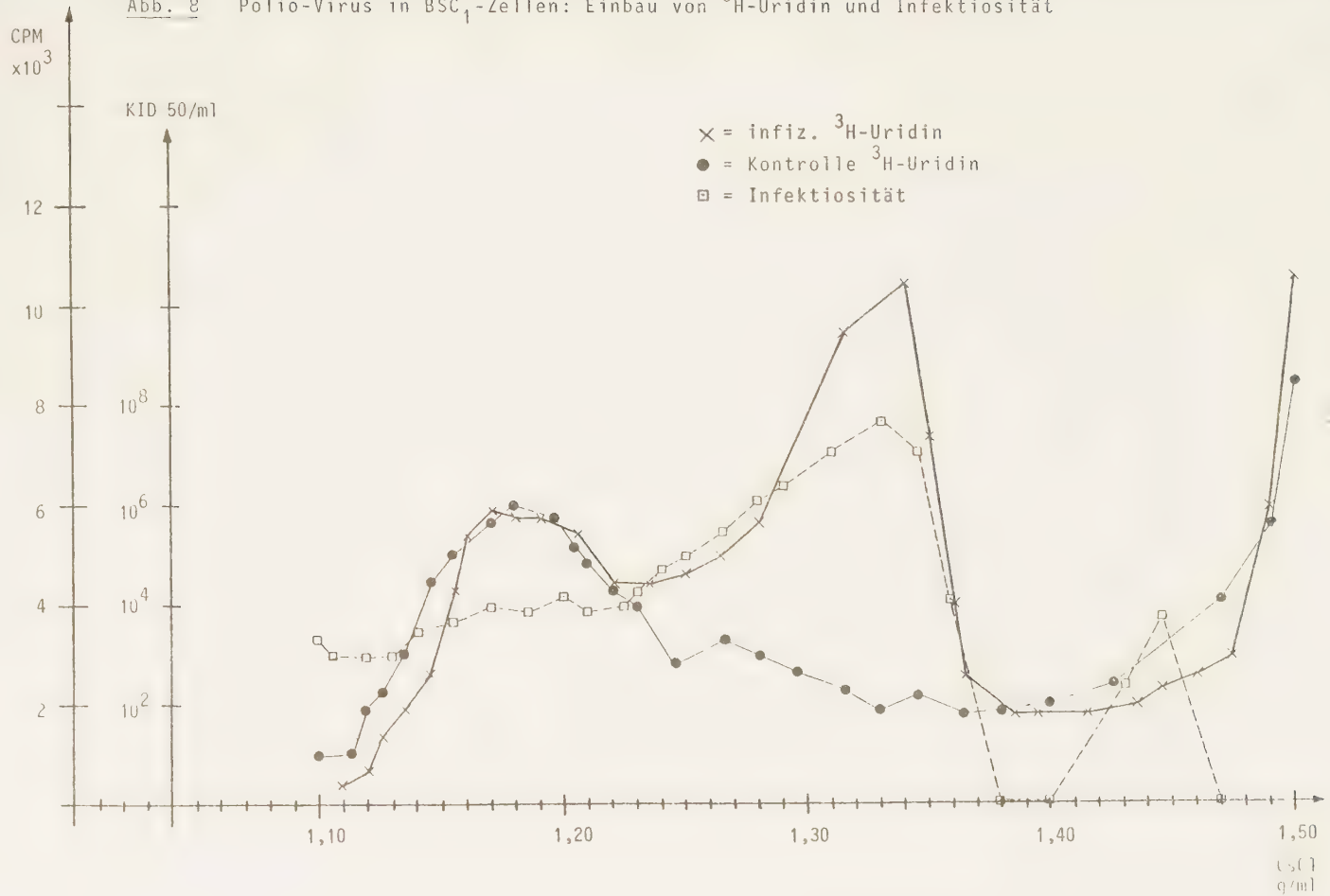


Abb. 8 Polio-Virus in BSC_1-Zellen: Einbau von ^{3}H-Uridin und Infektiosität



3.2.4 Versuche zum Nachweis einer reversen Transkriptase

Zum Versuch, in Borna-Virus-Material reverse Transkriptase nachzuweisen, wurden Präparationen aus infizierten BSC_1- und RK_{13}-Zellen verwendet. Das Ausgangsmaterial enthielt beim BSC_1-Material ca. $10^{6,0}$ Infektiöse Einheiten (IE)/ml, bei RK_{13}-Material ca. $10^{4,5}$ IE/ml. Extrakte nicht infizierter Zellen liefen in der Untersuchung parallel. Nach Reinigung und Konzentrierung des Virusmaterials (siehe "Material und Methoden")stand somit für die Reaktion eine Virusmenge zur Verfügung, die einer Infektiosität von ca. $10^{5,7}$ IE bei BSC_1- und $10^{4,2}$ IE bei RK_{13}-Material entsprach.

Als Kontrollen mit bekanntem Gehalt an reverser Transkriptase dienten Präparationen von OS-2- und OS-5-Virus, vorliegend als virushaltiges Kulturmedium aus permanent infizierten Zellkulturen.

Die Präparation ist in "Material und Methoden"angegeben; die bei der Reaktion zur Verfügung stehende Virusmenge betrug ca. 1 µg (Infektiosität nicht nachgewiesen).

Ergebnis:

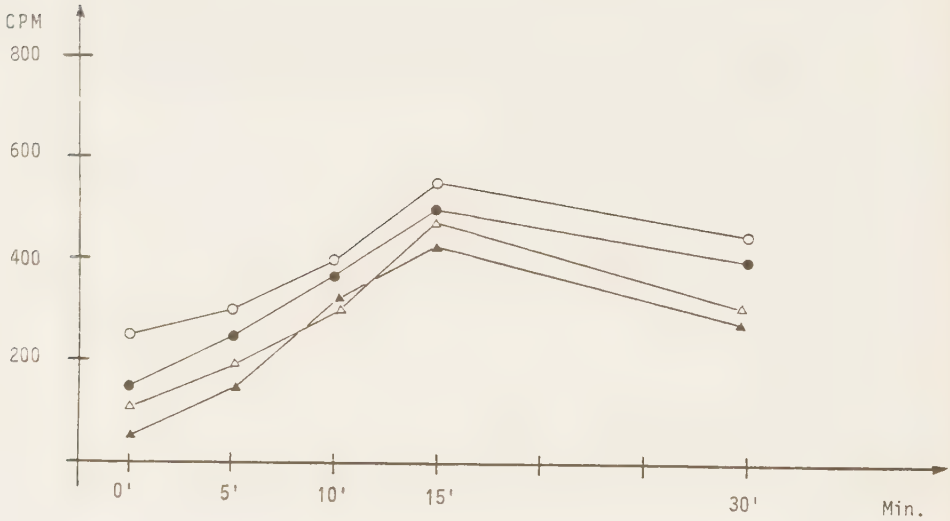
Borna-Virus:

Die Enzymreaktion mit dem Primer-Template Ribohomopolymer (rA) und Desoxyoligomer (dT) wie auch mit dem Primer-Template Desoxyribohomopolymer (dA) und Desoxyoligomer (dT) war sowohl bei Borna-Virus-infizierten als auch bei nicht infizierten Zellkulturen gleich hoch (Abb.9 und 10). Ein Hinweis auf eine reverse Transkriptase war somit nicht gegeben.

Kontrollviren:

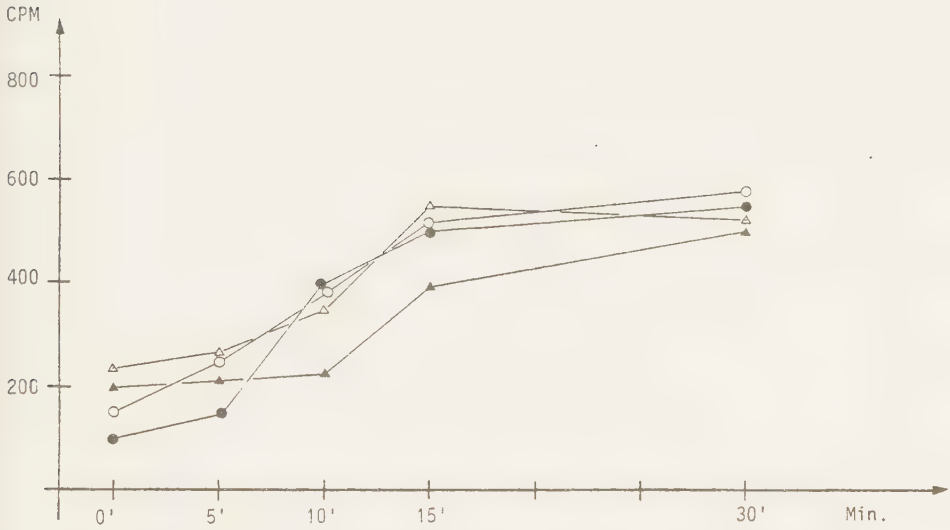
Bei den verwendeten Retroviren ergab sich bei Einsatz des Primer-Template (rA) x (dT) nach 30 Min. Reaktionszeit eine Enzymaktivität, die gegenüber der mit dem Primer-Template (dA) x (dT) um 4 Zehnerpotenzen erhöht war. Dies weist eindeutig auf die Anwesenheit einer reversen Transkriptase in den Osteosarkomviren OS-2 und OS-5 hin. Den typischen Verlauf einer derartigen Reaktion geben die Abb. 11 und 12 wieder.

Abb. 9 Borna-Virus aus BSC_1-Zellen: Versuch zum Nachweis der reversen Transkriptase



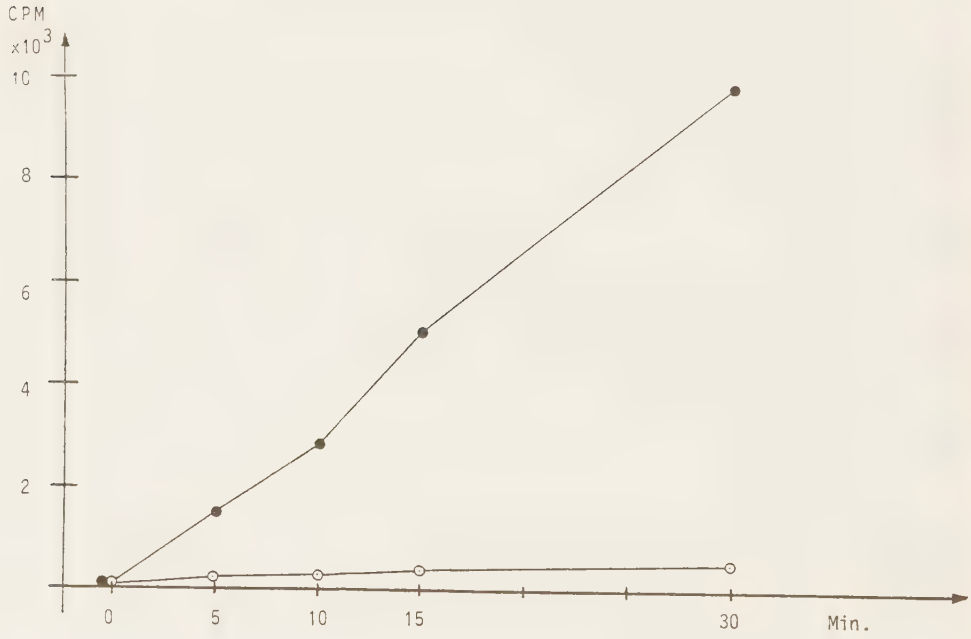
● = infiz. (rA)x(dT)
○ = infiz. (dA)x(dT)
▲ = nicht infiz. (rA)x(dT)
△ = nicht infiz. (dA)x(dT)

Abb. 10 Borna-Virus aus RK_{13}-Zellen: Versuch zum Nachweis der reversen Transkriptase



● = infiz. (rA)x(dT)
○ = infiz. (rA)x(dT)
▲ = nicht infiz. (rA)x(dT)
△ = nicht infiz. (rA)x(dT)

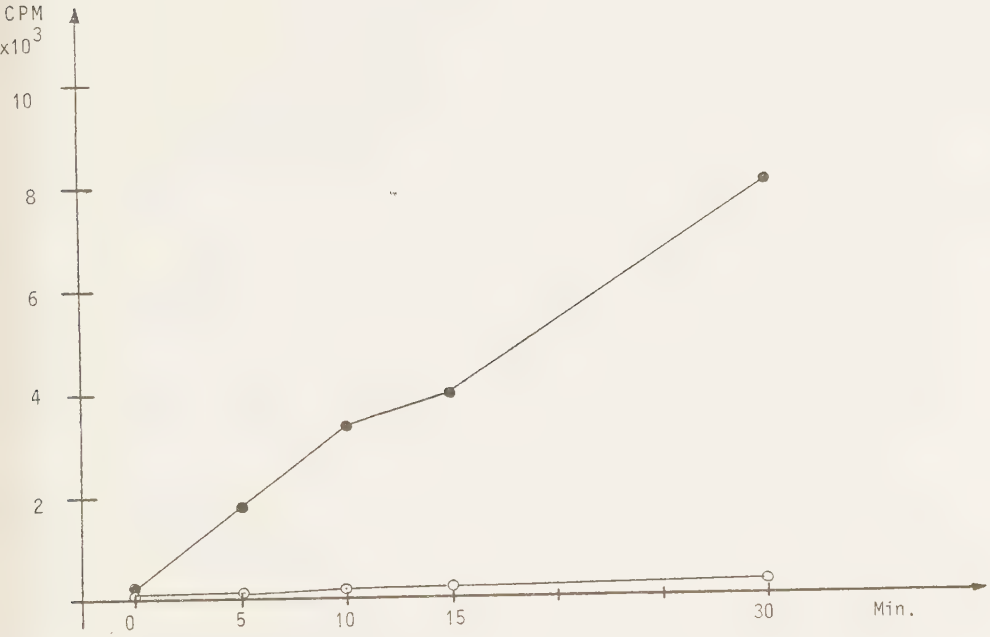
Abb. 11 Nachweis von reverser Transkriptase bei OS-2-Virus



● = infiz. (rA)x(dT)

⊙ = infiz. (dA)x(dT)

Abb. 12 Nachweis von reverser Transkriptase bei OS-5-Virus



● = infiz. (rA)x(dT)

⊙ = infiz. (dA)x(dT)

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Klassifizierung der Virusarten beruht primär auf morphologisch-chemischen Kriterien. Seit einigen Jahren gilt als einer der wichtigsten Parameter der Typ des genetischen Materials und die Genomstrategie. Die Kenntnis von Virus-Nukleinsäure und Virus-induzierten Enzymen (z. B. reverser Transkriptase) ist die Grundlage für das Verständnis der Vorgänge im Virus-Zell-System (Virusvermehrung, Cytopathogenität, Viruspersistenz).

Borna-Virus ist bisher nicht klassifiziert, andererseits weiß man, daß es ein besonderes Verhältnis zur infizierten Zelle besitzt (Assoziation an Zellbestandteile; fehlende Cytopathogenität; Fähigkeit zur Persistenz). Es war deshalb besonders interessant, die entsprechenden Verhältnisse bei Borna-Virus aufzuklären.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit einigen der gängigen Methoden den Nukleinsäure-Typ des Borna-Virus zu bestimmen. Dabei sind einige interessante Ergebnisse zutage getreten. Bereits die Befunde bei der Acridin-Orange-Färbung deuten an, daß in den Borna-Einschlüssen einzelsträngige RNS enthalten ist: Die Einschlüsse färbten sich orange-rot und waren labil gegenüber RNase-Behandlung. Es muß jedoch dabei beachtet werden, daß nicht nur Nukleinsäure, sondern auch andere Bestandteile, z. B. Proteine (Virusantigen) angefärbt werden, und daß Färbungen zu verschiedenen Zeitpunkten des Replikationszyklus unterschiedliche Resultate ergeben können (47, 66, 107, 124).

Die Versuche mit Antimetaboliten zeigten dagegen eindeutig, daß Borna-Virus RNS enthält. Ein Beweis hierfür ist die Tatsache, daß die Virusvermehrung in Gegenwart halogenierter Nukleoside nicht gehemmt wird. Halogenierte Nukleoside hemmen ausnahmslos alle DNS-haltigen Viren, während von den RNS-Viren nur diejenigen beeinträchtigt werden, die während

der Replikation über eine viruseigene DNS-Polymerase (reverse Transkriptase) DNS als essentiellen Zwischenschritt bilden (Retroviren) (57). Außerdem wird die Vermehrung von Borna-Virus durch die DNS-Hemmer Actinomycin D und Mitomycin C nicht herabgesetzt. Auch sie hemmen die Replikation DNS-haltiger Viren und derjenigen RNS-Viren, die eine reverse Transkriptase besitzen (138). In Gegenwart der anderen eingesetzten Antimetaboliten verhielt sich Borna-Virus ebenfalls wie RNS-haltige Viren: Die Multiplikation wurde durch Distamycin A nicht beeinflußt, während Behandlung mit 6-Azauridin die Virus-Vermehrung signifikant einschränkte oder komplett blockierte. Hemmung durch 6-Azauridin wurde auch bei Staupe-Virus (102) sowie SSPE- und Masern-Virus (105, 140) beobachtet. Die Replikation von Borna-Virus wird in Gegenwart von Ara-C stark eingeschränkt. Dieser Antimetabolit wird allgemein als Hemmer von DNS-Viren angesehen, wobei aber unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur zu finden sind. Da Ara-C sowohl in zelluläre DNS als auch in RNS eingebaut werden soll (21), ist es möglich, daß es auch die Replikation von gewissen RNS-Viren zu blockieren vermag, wie es z. B. bei Tollwut-Virus (13, 48) nachgewiesen worden ist.

Die zeitlichen Verhältnisse bei der Hemmung der Borna-Virusvermehrung durch 6-Aza und Ara-C deuten darauf hin, daß die Hemmung nicht auf einer Zellschädigung beruht, sondern auf der spezifischen Blockierung eines oder mehrerer Vorgänge bei der Virussynthese selbst. Zugabe der genannten Antimetaboliten vor der Infektion mit Borna-Virus hatte nämlich keinen virushemmenden Effekt. Die entscheidende, sensible Vermehrungsphase scheint bis zum 3. Tag nach Infizierung zu dauern, da in diesem Zeitraum die Beeinträchtigung der Virusreplikation am stärksten ausgeprägt war. Danach war die Virusvermehrung nicht mehr deutlich zu beeinflussen. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Befunden von DANNER und MAYR (25) überein, nach denen die Borna-Virusvermehrung eine Latenzphase von 2 Tagen besitzt.

Die vergleichenden Untersuchungen mit einigen bekannten Virusarten zeigten, daß Versuche mit Antimetaboliten nicht generell zu eindeutigen Ergebnissen führen müssen. Es bestehen große Unterschiede hinsichtlich Zellsystem und Toxizität; hierdurch kann eine geringe Virusvermehrung vorgetäuscht werden. Eindeutig sind jedoch stets die Versuche mit halogenierten Nukleosiden (JUdR und BUdR). Außerdem muß damit gerechnet werden, daß im untersuchten System ein zweiter Mechanismus abläuft, der die Virusvermehrung positiv oder negativ beeinflußt, und der seinerseits durch bestimmte Antimetaboliten unterdrückt wird. Dies könnte auch im untersuchten System mit Borna-Virus der Fall sein. Hierfür spricht möglicherweise der Befund, daß die Vermehrung von Borna-Virus in Gegenwart von Actinomycin D (0,1 µg/ml) um das 10- bis 1000-fache gesteigert wird. Actinomycin D ist z. B. als Hemmer der Interferonsynthese bekannt (135) und kann wahrscheinlich dadurch die Ausbeute bei verschiedenen Virusarten steigern (1, 3, 82). SPROCKHOFF et al. (127)konnten zwar keine Interferonsynthese bei der Borna-Virus-Infektion im Kaninchen feststellen; daß allerdings Interferon bereits in Mengen wirken kann, die mit den üblichen Labormethoden nicht nachweisbar sind, stellen SEKELLICK und MARCUS (121) fest. Möglich ist auch, daß andere in der Zelle sich abspielende und mit der Synthese von Borna-Virus interferierende Vorgänge durch Actinomycin D gehemmt werden. Eine unerkannte Infektion mit C-Typ-Viren könnte ein derartiger Faktor sein (68). Schließlich könnte die Steigerung der Virusvermehrung durch Actinomycin D ganz einfach darauf zurückzuführen sein, daß diese Substanz durch Stimulierung der Messenger-RNS die allgemeine intrazelluläre Proteinsynthese und damit auch die Virusproduktion stimuliert (74).

Als eindeutiger Beweis für den Nukleinsäure-Typ einer Virusart wird der Nachweis des eingebauten Nukleosids Uridin (RNS-Viren) bzw. Thymidin (DNS-Viren) angesehen. Studien von LUDWIG und BECHT (79) mit radioaktiv markierten Nukleosiden demonstrieren, daß in Borna-Virus-infizierten Zellkulturen Strukturen gebildet und ins Medium abgegeben werden, die

- gemessen am Einbau des angebotenen, markierten Uridins - RNS enthalten. Da im Zellkulturmedium Infektiosität nicht gefunden wird, handelt es sich möglicherweise um inkomplette Viruspartikel. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Einbau von radioaktiv markiertem Uridin in das zellgebundene, infektiöse Virus nachzuweisen. Während diejenigen Zellelemente, die DNS und damit eingebautes Thymidin enthielten, sich außerhalb des eingesetzten Dichtegradienten anreicherten, stellte sich Uridin-haltiges Zellmaterial genau in dem Dichtebereich ein, in dem auch die Borna-Infektiosität zu finden ist. Es war deshalb bis auf den einen in Abb. 6 gezeigten Versuch nicht möglich, in Borna-infizierten Zellkulturen einen gegenüber Kontrollkulturen verstärkten Einbau von Uridin zu messen. Dieser Versuch blieb also ohne eindeutige Aussage, warf aber die Problematik solcher Untersuchungen auf. Eine Hauptschwierigkeit liegt erstens in den quantitativen Verhältnissen. Bei allen in der Literatur angegebenen entsprechenden Versuchen wurde mit mindestens 100 - 1000-fach höheren Viruskonzentrationen gearbeitet (14, 59, 102). Auch war es möglich, eine bessere Virusreinigung vorzunehmen, da immer infiziertes Kulturmedium als Ausgangsmaterial zur Verfügung stand. Eine weitere Schwierigkeit bei den Versuchen mit Borna-Virus war die Tatsache, daß das Maximum des ^{3}H-Uridin-Einbaus im Zellmaterial genau in der Dichte lag, wo auch die Infektiosität von Borna-Virus zu finden war. Dies war ebenfalls bei den zum Vergleich durchgeführten Untersuchungen mit Schweinepest-Virus der Fall. Bei Viren, deren Dichte in einem anderen Bereich liegt, sind die Ergebnisse eindeutiger. Der Versuch mit Polio-Virus demonstriert diese Gegebenheiten. Polio-Virus war im Dichte-Gradienten in einem Dichtebereich bei 1,15 - 1,20 in geringer Menge an Zellmaterial gebunden.Radioaktivität trat in diesem Dichtebereich in infizierten wie in Kontrollpräparationen in gleicher Stärke auf (siehe Abb. 8). Die Hauptvirusmenge stellte sich in diesem Versuch jedoch bei einer Dichte ein, bei der offensichtlich kein Zellmaterial mehr zu finden ist. Entsprechend war die Radioaktivität in den virushaltigen Präparationen bedeutend stärker als in den Kontrollen. Virus

trat in geringer Menge ebenfalls bei einer höheren Dichte auf. Diese Virusmenge vermochte jedoch nicht auch einen Anstieg der Radioaktivität zu induzieren. Die genannten Ergebnisse demonstrieren die Abhängigkeit derartiger Versuche sowohl von der Virusdichte als auch von den quantitativen Verhältnissen.

Vorausgesetzt, daß Borna-Virus RNS enthält, erstaunt das Auftreten von Virusantigen im Zellkern(87).Man könnte annehmen, daß ähnliche Verhältnisse bestehen wie bei den Retroviren, bei denen ein Vermehrungszwischenschritt über den Zellkern abläuft. Mit der Immunofluoreszenz ist auch bei den den Retroviren zugerechneten Foamy-Viren (99) Virusantigen intranukleär zu finden. Interessant war deshalb zu untersuchen, ob Borna-Virus ebenfalls eine reverse Transkriptase besitzt. Bei den entsprechenden Versuchen konnte in Borna-Virus-Präparationen jedoch keine spezifische Enzymaktivität festgestellt werden. Es wäre verfrüht, aus diesen Ergebnissen zu schließen, daß Borna-Virus keine reverse Transkriptase besitzt, da derartige Untersuchungen durch eine Vielzahl von teilweise noch unbekannten Faktoren beeinflußt werden (153). Die quantitativen Verhältnisse dürften auch hier eine entscheidende Rolle spielen. Andererseits sprechen auch die Studien mit Antimetaboliten dafür, daß Borna-Virus keine reverse Transkriptase besitzt, denn es wird in seiner Vermehrung weder von Jod-Desoxyuridin noch von Actinomycin D oder Mitomycin C gehemmt, alles Substanzen, die als DNS-Hemmer die Replikation solcher RNS-Viren beeinträchtigen, die eine - über die reverse Transkriptase induzierte - DNS-Zwischenphase durchlaufen (57, 139).

Als RNS-Virus ohne reverse Transkriptase stellt sich Borna-Virus mit all seinen anderen Eigenschaften (Dichte, Größe, Antigenverteilung, Struktur) außerhalb der heute charakterisierten Virusgruppen. Ob es allerdings eine eigene, neuartige Gruppe repräsentiert, wird von den Ergebnissen weiterer Forschungen abhängen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Als Beitrag zur weiteren Charakterisierung des Borna-Virus und seiner Vermehrungs-Strategie wurde der Nukleinsäuretyp mit verschiedenen direkten und indirekten Methoden untersucht. Bereits die Färbung intrazellulär gelagerten Virusmaterials mit Acridin-Orange einschließlich enzymatischer Versuche mit Nucleasen deuten darauf hin, daß eine einzelsträngige RNS vorliegt. Die vergleichende Viruszüchtung mit und ohne Zusatz verschiedener Antimetaboliten bestätigte die Annahme, daß Borna-Virus RNS als genetisches Material besitzt. Die Virusvermehrung wurde durch 6-Azauridin, welches vor allem die Replikation von RNS-Viren hemmt, entscheidend unterdrückt. Die sensible Phase der Borna-Virusvermehrung liegt zwischen Infizierung und 3. Tag danach. Jod-Desoxyuridin, ein typischer Hemmer der DNS-Synthese, hatte keinen negativen Einfluß auf die Vermehrung des Borna-Virus. Auch andere als DNS-Hemmer bekannte Substanzen wie Actinomycin D, Distamycin A, Mitomycin C und Rifampicin konnten die Vermehrung von Borna-Virus quantitativ nicht beeinträchtigen (Ausnahme: Cytosin-Arabinosid). Die Befunde beweisen auch, daß Borna-Virus während seiner intrazellulären Vermehrung keinen DNS-abhängigen Schritt durchläuft wie z. B. die Retroviren. In dieselbe Richtung deutet die Tatsache, daß in Borna-Viruspräparationen keine reverse Transkriptase gefunden werden konnte.

Versuche zur Nukleinsäurebestimmung über den Einbau radioaktiv markierter Nukleoside schlugen fehl, da sich Borna-Virus offenbar an Zellbestandteile heftet, die selbst RNS enthalten und die angebotenen Nukleoside einbauen. Unterschiede zu scheininfizierten Kontrollkulturen konnten auf diese Weise nicht festgestellt werden.

Neben den genannten Ergebnissen haben eigene Versuche mit einer Reihe verschiedener Virusarten und das Studium der

einschlägigen Literatur zu zwei wesentlichen Erkenntnissen geführt:

1. Versuche zum Einbau bzw. späteren Nachweis radioaktiv markierter Virusbausteine sind in solchen Virus-Zell-Systemen zumindest erschwert, bei denen das Virus nicht aus den Zellen freigesetzt wird. Dies gilt vor allem für Virusarten, deren Dichte im selben Bereich liegt wie zelluläre Strukturen.

2. Von den zur Nukleinsäure-Typisierung eingesetzten Antimetaboliten liefern nur die halogenierten Nukleoside sichere Ergebnisse: Sie interferieren mit der Replikation sämtlicher DNS-Viren sowie derjenigen RNS-Viren, deren Vermehrung über einen DNS-Zwischenschritt abläuft. Die Wirkung vieler anderer Antimetaboliten auf die Virusvermehrung scheint dagegen weitgehend von Faktoren wie Zellart, Virusstamm, Infektionsdosis etc. beeinflußt zu werden. Die mit derartigen Substanzen gewonnenen Resultate können nur bedingt und nur innerhalb weiterer Versuche gewertet werden.

6. SUMMARY

Further characterization of Borna virus: Studies on the type of nucleic acid and attempts to find a reverse transcriptase

As a contribution to further characterization of Borna virus and its replication strategy, the type of its nucleic acid was studied applying several direct and indirect methods. The staining behaviour of intracellular virus material towards acridine orange with and without previous use of nucleases point to the presence of single stranded RNA. Also the comparative cultivation of Borna virus with and without antimetabolites demonstrates that RNA is the genetic component of this virus. Virus multiplication in cell cultures was decisively suppressed by 6-azauridine, a substance interfering mainly with the replication of RNA viruses. The sensitive period of the virus multiplication is between infection and 3rd day postinfection. Iododeoxyuridine, a typical inhibitor of DNA synthesis, did not suppress the multiplication of Borna virus. Also other substances known as DNA inhibitors, e.g. actinomycin D, distamycin A, mitomycin C or rifampicin (except cytosine arabinoside), revealed no negative effect on the multiplication of Borna virus. At the same time these results demonstrate that no DNA dependent step (as e.g. with retroviruses) is involved in the replication of Borna virus. Same evidence is given by the fact that no reverse transcriptase could be found in Borna virus preparations.

Attempts to define th nucleic acid type of Borna virus via the incorporation and demonstration of H^3 labelled nucleosides were not successful. Obviously, Borna virus is associated with cellular structures containing RNA and utilizing the added nucleosides by themselves. No differences could be established between virus infected and

mock infected cell cultures.

In addition to the above results, own comparative experiments with a series of different viruses as well as the critical evaluation of the relevant literature provided the following informations:

1. Experiments with labelled compounds for the characterization of viral structures are hampered in those virus-cell systems where the virus is not released from the infected cells. This applies especially for viruses with a densitiy in the same range as cellular structures.

2. In experiments with antimetabolites, only the halogenated nucleosides are able to define the genetic material of a virus. They regularly suppress the multiplication of DNA viruses and of those RNA viruses that possess a DNA intermediate during their replication. The suppressive effect of the other metabolites, however, seems to be strongly influenced by such factors as cell type, virus strain or multiplicity of infection. Results obtained with those substances should only be taken as an indication within more complex studies.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDERSON, C.D., und J.G. ATHERTON, 1964: Effect of actinomycin D on measles virus growth and interferon production. Nature 203, 670-671.

2. ARCHER, B.G., T.B. CRAWFORD, T.C. Mc GUIRE und M.E. FRAZIER, 1977: RNA-dependent DNA polymerase associated with equine infectious anaemie virus. J. Virol. 22, 16-22.

3. AYNAUD, J.M., 1968: Etude de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la peste porcine. Rech. vêtér. I, 25-36.

4. BALBONI, P.G., A. MINIA, M.P. GROSSI, G. BARBANTI-BRODANO, A. MATTIOLI und L. FIUME, 1976: Activity of albumin conjugates of 5-fluordeoxyuridine and cytosine arabinoside on poxviruses as a lyosomotropic approach to antiviral chemotherapy. Nature 264, 181-183.

5. BALTIMORE, D., 1970: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature 226, 1209-1211.

6. BARRY, R.D., 1964: The effects of actinomycin D and ultraviolet irridiation on the production of fowl plague virus. Virology 24, 563-569.

7. BECKER, Y.,1976: Antiviral Drugs. Monographs in Virology 11, 1-104.

8. BERECZKY, E., und L. ARCHETTI, 1967: Acridine orange staining of monkey kidney cells infected with Adenovirus and their associated viruses. Arch. ges. Virusforsch. 22, 426-432.

9. BLACK, D.N., und F. BROWN, 1968: The influence of mitomycin C, actinomycin D and ultraviolet light on the replication of the virus of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. J. gen. Virol. 3, 453-457.

10. BONIN, O., 1973: Quantitativ-virologische Methodik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

11. BUDDECKE, E., 1971: Grundriß der Biochemie. Walter de Gruyter & Co-Verlag, Berlin.

12. BURKE, D. C., 1976: Is interferon only an antiviral agent? Sci. Prog. Oxf. 63, 141-146.

13. CAMPBELL, J.B., R.F. Maes, T.J. WIKTOR und H. KOPROWSKI, 1968: The inhibition of rabies virus by arabinosylcytosin. Studies on the mechanism and specifity of action. Virology 34, 701-708.

14. CARTER, M.F., N. BISWAL und W. R. RAWLS, 1973: Characterization of nucleic acid of pichinde virus. J. Virol. 11, 61-68.

15. CHANDRA, P., A. GÖTZ und A. WACKER, 1972: Some structural requirements for the antibiotic action of distamycins. II. Structural modification of the side chains in distamycin A molecule. FEBS Letters 19 (4), 327-330.

16. CHARMAN, H.P., S. BLADEN, R.V. GILDEN und L. COGGINS, 1976: Equine infectious anemia virus: Evidence favoring classification as a retrovirus. J. Virol. 19, 1073-1079.

17. CHEEVERS, W.P., B.G. Archer und T.B. CRAWFORD, 1977: Characterization of RNA from equine infectious anemia virus. J. Virol. 24, 489-497.

18. COHEN, S.S., 1976: The lethality of aranucleotides. Medical Biology 54, 299-326.

19. COOPER, P.D., 1966: The inhibition of poliovirus growth by actinomycin D and the prevention of the inhibition by pretreatment of the cells with serum or insulin. Virology 28, 663-678.

20. COTTRAL, G.E., 1978: Manual of standardized methods for veterinary microbiology. Cornell University Press, Ithaca and London.

21. CRASEY, W.A., 1975: Arabinosyl cytosin. In: Sartorelli, A. C. und D.G. Johns (Hrsgb.), Antineoplastic and immunosuppressive agents, Part II, 232-256. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

22. DANNER, K., und P.A. BACHMANN, 1970: Vermehrung und Ausbreitung von Schweinepest-Virus, Stamm München 1, in PK 15-Zellen. Zbl. Vet. Med. B 17, 353-362.

23. DANNER, K., D. HEUBECK und A. MAYR, 1978: In vitro studies on Borna Virus. I. The use of cell cultures for the demonstration, titration and production of Borna virus. Arch. Virol. 57, 63-75.

24. DANNER, K., und A. MAYR, 1973: Fluorreszensserologische Untersuchungen über das Auftreten von Borna-Virusantigen in Zellkulturen aus Gehirnexplantaten infizierter Kaninchen. Zbl. Vet. Med. B 20, 497-508.

25. DANNER, K., und A. MAYR, 1979: In vitro studies on Borna virus. II. Properties of the virus. Arch. Virol. 61, 261-271.

26. DAS, J., und J. MANILOFF, 1976: Replication of mycoplasma virus MVL 51. IV. Inhibition of viral synthesis by rifampin. J. Virol. 18, 969-976.

27. DI MARCO, A., M. GHIONE, A. MIGLIACCI, E. MORVILLO und A. SANFILIPPO, 1963: zitiert nach Chandra, P., et al., 1972.

28. DIGGELMANN, H., und Ch. WESSMANN, 1969: Rifampicin inhibits focus formation in chick fibroblasts infected with Rous sarcoma virus. Nature 224, 1277-1279.

29. DIWAN, A., und W.H. PRUSOFF, 1968: The effect of 5-iodo-2'-deoxyuridine-5'-tiphosphate, an allosteric inhibitor on deoxycitidylate deaminase, induced by herpes simplex-virus. Virology 34, 184-186.

30. DULBECCO, R., und M. VOGT, 1952: Monolayer tissue cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 376.

31. ERFLE, V., S. SCHULTE-OVERBERG, K.-H. MARQUART, I.-D.ADLER, u. A. LUTZ, 1979: Establishment and characterization of C-type RNA virus-producing cell lines from radiation induced murine osteosarcom s. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 94, 149-162.

32. ERIKSON, R.L., 1969: Studies of the RNA from avian myeloblastosis virus. Virology 37, 124-131.

33. ESTEBAN, M., 1977: Rifampicin and vaccinia DNA. J. Virol. 21, 796-801

34, FALKE, D., und B. RADA, 1970: 6-Azauridine as an inhibitor of the Synthesis of herpes virus hominis. Acta virol. 14, 115-123.

35. FIALA, M., A.W. CHOW, K. MIYASAKI und L.B. GUZE, 1974: Susceptibility of herpesviruses to three nucleoside analogues and their combinations and enhancement of the antiviral effect at acid pH. J. Infect. Dis. 129, 82-85.

36. FRANCIS, R.D., und H.B. BRADFORD, J., 1976: Some biological and physical properties of molluscum contagiosum virus propagated in cell culture. J. Virol. 19, 382-388.

37. GAUNTT, Ch. J., 1977: Actinomycin D acts on the intracellular process to inhibit replication of rhinovirus typ 14 (39724). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155, 252-258.

38. GRADO, C. und A. OHLBAUM, 1973: The effect of rifampicin, actinomycin D and mitomycin C on poliovirus and foot- and-mouth disease virus replication. J. gen. Virol. 21, 297-303.

39. GREEN, J.A.,und S. BARON, 1975: 5-iodeoxyuridine potentiation of the replication in vitro of several unrelated RNA-and DNA-Viruses. Science 190, 1099-1101.

40. GREER, S., J. SCHILDKRAUT, T. ZIMMERMANN und H. KAUFMANN, 1975: 5-halogenated analogs of deoxycytidine as selective inhibitors of the replication of herpes simplex-viruses in cell culture and related studies of intracranial herpes simplex-virus infectious in mice. Ann. N.Y. Acad.Sci. 255, 359-365.

41. GREŠÍKOVÁ, M., B. RADA, 1972: Studies on arbovirus haemagglutinin. Differential inhibition of haemagglutinine formation by 6-azauridine and uridine kinase - containing cell free extract. Acta virol. 16, 231-243.

42. GRIMLEY, Ph., M., E.N. ROSENBLUM, J. MIMS und B. MOSS, 1970: Interruption by rifampicin of an early stage in vaccinia virus morphogenesis: accumulation of membranes which are precursors of virus envelopes. J. Virol. 6, 519-533.

43. GURGO, C., R. RAY und M. GREEN, 1972: Rifamycin derivates strongly inhibiting RNA → DNA polymerase (reverse transcriptase) of murine sarcoma viruses. J. Nat. Cancer Inst. 49, 61-79.

44. GURGO, C., R.K. RAY, L. THIRY und M. GREEN, 1971: Inhibitors of the RNA and DNA dependent polymerase activities of RNA tumour virus. Nature New Biology 229, 111-114.

45. HAHNEFELD, H., und E. HAHNEFELD, 1964: Die Nukleinsäuren des Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis und des Bläschenausschlags des Rindes (Exanthema coitale vesiculosum bovis) Arch. Exp. Vet. Med. 18, 921-928.

46. HALL, W.W., und V. TER MEULEN, 1977: The effect of actinomycin D on RNA synthesis in measles virus-infected cells. J. gen. Virol. 34, 391-396.

47. HAMPTON, E.G., 1963 und 1964: zitiert nach R. M. Jamison und H. D. Mayor, 1965.

48. HARMON, M.W., und B. JANIS, 1976: Effects of cytosine arabinoside, adenine arabinoside and 6-azauridine on rabies virus in vitro and in vivo. J. Inf. Dis. 133, 7-13.

49. HARTER, D.H., H.S. ROSENKRANZ und H.M. ROSE, 1969: Nucleic acid content of visna virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 927-933.

50. HELLER, E., 1963: Enhancement of Chikungunya virus replication and inhibition of interferon production by actinomycin D. Virology 21, 652-656.

51. HELLER, E., M. ARGMAMAN, H. LEVY und N. GOLDBLUM, 1969: Selective inhibition of vaccinia virus by the antibiotic rifampicin. Nature 222, 273-274.

52. HENRY, C., 1967: Labeling of viruses with isotopes. In: Maramorosch, K., und H. Koprowski (Hrsgb.), Methods in Virology, Band II, 427-462. Academic Press, New York, London.

53. HESS, W.R., 1971: African swine fever virus. In: Gard, S., C. Hallauer und K.F.Meyer (Hrsgb.), Virology Monographs. Vol. 9, 1-33, Springer Verlag, Wien, New York.

54. HIRSCHMANN, S.Z., 1971: Inhibition of viral nucleic acid transcriptases. Transact. N.Y. Acad. Sci.,33, 595-606.

55. HOLDER, W.D.jr., W.G. ROBEY, und G.F. VAN DE WOUDE, 1974: Activation of a C-type virus from the human carcinoma cell line HBT-3 by iododeoxyuridine and testosterone. Nature 249, 759-762.

56. HOLMES, A.W., J. GILSON und F. DEINHARDT, 1964: Inhibition of interferon production by 5-iodo-2'-deoxyuridine. Virology 24, 229-232.

57. HOCKS, J.J. und C.J. GIBBS, jr. 1975: The foamy viruses. Bacteriol.Rev. 39, 169-185.

58. HORZINEK, M.,1966: Characterization of hog cholera virus. J. Bact. 92, 1723-1726.

59. Inaba, Y., Y. TANAKA, T. OMORI und M. MATUMOTO, 1973: Physicochemical properties of bovine respiratory syncytial virus. Japan. J. Microbiol. 17, 211-216.

60. JAMISON, R.M. und H.D. MAYOR, 1965: Acridine orange staining of purified rat virus strain X 14.J. Bacteriol. 90, 1486-1488.

61. JENTZSCH, K.-D., 1970: Interferon (Induktion, Eigenschaften, Nachweis, Wirkungsweise, Bedeutung) Monatsh. Vet. Med. 25, 835-840.

62. KÄRBER, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 162, 480.

63. KALMAN, T.J., 1975: Molecular aspects of the mechanism of action of 5-fluorodeoxyuridine. Ann. N.Y. Acad. Sci. 255, 326-331.

64. KAPLAN, A.S., und T. BEN PORAT, 1966: Mode of antiviral action of 5-iodouracil deoxyriboside. J. molec. Biol. 19, 320-332.

65. KAPLAN, A.S., 1973: The Herpes viruses. Academic Press, New York, San Francisco, London.

66. KASTEN, F.H., und A.E. CHURCHILL, 1965: Cytochemistry of cytoplasmic and intranuclear inclusions induced by bovine parainfluenza 3-virus (SF-4) in human cell cultures, J. Histochem. Cytochem. 14, 187-195.

67. KELLY, D.C., und N.J. DIMMOCK, 1974: Fowl plague virus replication in mammalian cell. Avian erythrocyte heterokaryons: Studies concerning the actinomycin D and ultraviolet light sensitive phase in influenza-virus replication. Virology 61, 210-222.

68. KELLY, E.A., und R.J. ASH, 1976: Effect of actinomycin D on plaque formation by mengovirus. Microbios 15, 7-13.

69. KORANT, B.D., und S. HALPEREN, 1975: Elektrophoretic analysis of capsid and non-capsid Polypeptides of echovirus 12 and selective inhibition of the formation of virus particles by actinomycin D. J. gen. Virol. 26, 239-248.

70. KOTLER, M., und Y. BECKER, 1971: Rifampicin and distamycin A as inhibitors of Rous sarcoma virus reverse transcriptase. Nature New Biology 234, 212-214.

71. KOTLER, M., und Y. BECKER, 1972: Effect of distamycin A and congocidine on DNA synthesis by Rous sarcoma virus reverse transcriptase. FEBS Letters 22, 222-226.

72. LAUGHLIN, C., und W.A. STROHL, 1976: Factors regulating cellular DNA synthesis induced by adenovirus infection Virology 74, 30-56.

73. LAVIALLE, Ch., A.G. MORRIS, H.G. SUÁREZ, S. ESTRADE, J. STEVENET und R. CASSINGENA, 1977: Simian virus 40 - chinese hamster kidney cell interaction. IV. Enhanced virus replication in infected cells upon treatment with mitomycin C. J. gen. Virol. 36, 137-149.

74. LEINWAND, L. und F.H. RUDDLE, 1977: Stimulation of in vitro translation of messenger RNA by actinomycin D and cordycepin. Nature 197, 381-383.

75. LIN, F.H.,und H. THORMAR, 1972: Properties of maedi nucleic acid and the presence of ribonucleic acid- and deoxyribonucleic acid-dependent deoxyribonucleic acid polymerase in the virions. J. Virol 10, 228-233.

76. LINDELL, T.J., 1976: Evidence for an extranucleolar mechanism of actinomycin D action. Nature 263, 347-349.

77. LONG, C., J.G. DERGE und B. HAMPAR, 1974: Procedure for activating Epstein-Barr virus early antigen in nonproducer cells by 5-iododeoxyuridin. J. nat. Cancer-Inst. 52, 1355-1357.

78, LOWY, D.R., W.P. ROWE. N. TEICH und J.W. HARTLEY, 1971: Murine leukemia virus: high frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromo-deoxyuridine. Science 174, 155-156.

79. LUDWIG, H., und H. BECHT, 1977: Borna, the disease - a summary of our present knowledge. In: Ter Meulen, V., und M. Katz (Hrsbg.). Slow virus infections of the central nervous system. 75-83. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

80. MARCIALIS, M.A., P. LA COLLA, M.L. SCHIVO, O. FLORE, A. FIRMO und B. LODDO, 1975: Low virulence and immunogenicity in mice and in rabbits of variants of herpes simplex-virus resistant to 5-iodo-2'-deoxyuridine. Experientia 31, 502.

81. MARCUS P.I., S.J. CIECIURA und T.T. PUCK, 1956: Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues. J. exp. Med. 104, 615.

82. MATUMOTO, M., 1966: Multiplication of measles virus in cell cultures. Bacteriol. Rev. 30, 152-176.

83. MAYOR, H.D., 1964: A labile intranuclear RNA associated with the development of adenoviruses. J. Exp. Med. 119, 433-441.

84. MAYOR, H.D., und A.R. DIWAN, 1961: Studies on the acridine orange staining of two purified RNA viruses: poliovirus and tabacco mosaic-virus. Virology 14, 74-82.

85. MAYOR, H.D., und N.O. HILL, 1961: Acridine orange staining of a single-stranded DNA bacteriophage. J. Virol. 14, 264-266.

86. MAYOR, H.D., und J.L. MELNICK, 1966: Small deoxyribonucleic acid-containing viruses (picodnavirus group) Nature 210, 331-332.

87. MAYR, A., und K. DANNER, 1972 a: In vitro-Kultivierung von Borna-Virus über Gehirn-Explantate infizierter Tiere. Zbl. Vet Med. B 19, 785-800.

88. MAYR, A., und K. DANNER, 1972 b: Production of Borna virus in tissue culture. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 140, 511-515.

89. MAYR, A., und K. DANNER, 1974: Persistent infections caused by Borna Virus. Infection 2, 64-69.

90. Mc CREA, J.F., und M.B. LIPMAN, 1967: Strand-length measurements of normal and 5-JUDR-treated vaccinia virus deoxyribonucleic acid released by the lein-schmidt method. J. Virol. 1, 1037-1044.

91. MORRIS, A.G., C. LAVIALLE, H.G. SUÂREZ, J. STEVENET, S. ESTRADE und R. CASSINGENA, 1977: Simian virus 40 - Chinese hamster kidney cell interaction. III. Characteristics of chemical induction in a clone of virogenic transformed cells. J. gen. Virol. 36, 123-135.

92. MOSS, B., E.N. ROSENBLUM und E. KATZ, 1969: Rifampicin: A specific inhibitor of vaccinia virus assembly. Nature 224, 1280-1284.

93. NAYAK, D.P., und R.F. RASMUSSEN jr., 1966: Influence of mitomycin C on the replication of influenza viruses. Virology 30, 673-683.

94. NICHOL, F.R., und D.R. TERSHAK, 1967: Effect of 5- fluorouracil and 6-azauridine on interferon action. J. Virol. 1, 450-451.

95. NORRLY, E.C.J., P. MAGNUSSON und M. GRONBERG, 1965: The nucleic acid of measles virus. Arch. ges. Virusforsch. 16, 81-83.

96. NORTHROP, R.L., 1969: Effect of puromycin and actinomycin D on a persistent mumps Virus infection in vitro. J. Virol. 4, 133-149.

97. OWENS, R.B., und A.J. HACKETT, 1972: Tissue culture studies of mouse mammary tumor cells and associated viruses. J. Nat. Cancer Inst. 49, 1321-1328.

98. PANCHEVA - GOLOVINSKA, S., 1975: Synergic action of distamycin A and hydroxyurea on the reproduktion of DNA virus in cell cultures. Acta. Virol. 19, 73-77.

99. PARKS, W.P., und G.J. TODARO, 1972: Biological properties of syncytium forming ("Foamy") viruses. Virology 47, 673-683.

100. PARKS, W.P., G.J. TODARO, E. M. SCOLNICK und S.A. AARONSON, 1971: RNA dependent DNA polymerase in primate syncytium-forming (foamy) viruses. Nature, 229, 258-260.

101. PAUL, N.R., S. IWAKATA, A.J. RHODES und N.A. LABZOFFSKY, 1974: Enhancing effect of halogenated pyrimidines (BUdR and JUdR) on the growth of rubella-virus in BHK-21 cells. Arch. ges. Virusforsch. 44, 144-146.

102. PHILLIPS, L.A., und R.H. BUSSEL, 1974: The nucleic acid of canine distemper virus: Effects of 6-azauridine and actinomycin D on viral replication, and the incorporation of uridine into virions. Am. J. Vet. Res. 35, 831-824.

103. PLOWRIGHT, W., 1968: Rinderpest-Virus. In: Gard, S., C. Hallauer und K.F. Meyer (Hrsgb.), Virology Monographs, Bd. 3, 25-110. Springer Verlag, Wien, New York.

104. PLUMMER G., und C.R. GOODHEART, 1974: Growth of murine cytomegalovirus in heterologous cell system and its enhancement by 5-iodo-2'-deoxyuridine. Infect. Immun. 10, 251-256.

105. PORTNER, A., und R.H. BUSSEL, 1973: Measles virus ribonucleic acid and protein synthesis: Effect of 6-azauridine and cycloheximide on viral repication. J. Virol. 11, 46-53.

106. PRUSOFF, W.H., Y.S. BAKHLE und J.F. MC CREA, 1963: Incorporation of 5-iodo-2'-deoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of vaccinia-virus. Nature 199, 1310-1311.

107. RABSON, A.S., L. KILHAM und R.L. KIRCHSTEIN, 1963: zitiert nach R.M. JAMISON und H.D. MAYOR, 1965.

108. RADA, B., und DRAGUN, M., 1976: Inhibition of Newcastle disease virus replication by 6-azauridine I. Inefficacy of purified uridine kinase, effect of adenosine 5'-triphosphate. Acta Virol. 20, 97-101.

109. RAKUSANOVA, T., W.P. SMALES, J.G. KAPLAN und P.H. BLACK, 1978: Replication of simian virus 40 in simian virus 40-transformed hamster kidney cells induced by mitomycin C oder 60 Co γ irradiation. Virology 88, 300-313.

110. RASHBAUM, S.A., und N.R. COZZARELLI, 1976: Mechanism of DNA synthesis inhibition by arabinosyl cytosin and arabinosyl adenine. Nature 264, 676-680.

111. REICH, E., R.M. FRANKLIN, A.J. SHATKIN und E.L. TATUM, 1962: Action of actinomycin D on animal cells and viruses. Biochemisty 48, 1238-1245.

112. REICH, E., R.M. FRANKLIN, A.J. SHATKIN und E.L. TATUM, 1961: Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. Science 134, 556-557.

113. RESSANG, A.A. und J.L. DEN BOER, 1967: Vortrag beim EWG-Treffen zur Bekämpfung der Schweinepest, Tübingen, 21.-22. Dez. 1967.

114. RICHMAN, D.D., und M.N. OXMAN, 1978: Antiviral agents. In: Weinstein, L., und B.N. Fields (Hrsgb.), Seminar in infections diseases. Vol. I, 200-255. Thieme, Stuttgart.

115. ROLLE, M., und A. MAYR, 1978: Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 4. Auflage. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

116. ROSEN, L., 1968: Reoviruses. In: Gard, S., C. Hallauer und K.F. Meyer (Hrsgb.), Virology Monographs, Bd. 1, 73-107. Springer Verlag, Wien, New York.

117. ROUBAL, J. 1977: Cytosine-arabinoside does not inhibit incorporation of ^{3}H-Thymidine in herpes simplex virus transformed cells. Arch. Virol. 53, 255-259.

118. ROWSON, K.E.K., und B.W.J. MAHY, 1975: Lactic dehydrogenases virus. In: Gard, S., und C. Hallauer (Hrsgb.), Virology Monographs, Bd. 13, Springer Verlag, Wien, New York.

119. RUSSEFF, C., L. WASSILEWA, V. MATEWA, N. DIKOWA und D. NACHKOV, 1969: Der Einfluß einiger Antimetaboliten auf die Vermehrung des Aujeszky-Virus. 1. Untersuchungen mit 5 JUDR. Zbl. Vet. Med. B 16, 702-708.

120. SCHLOM, J., D.H. HARTER, A. BURNEY und S.SPIEGELMANN, 1971: DNA-polymerase activities in virions of visna virus, a causative agent of a "slow" neurological disease. Proc. Nat. Acad. Science 68, 182-186.

121. SEKELLICK, M.J., und P.I. MARCUS, 1978: Persistent infection. I. Interferon-inducing defective-interfering particles as mediators of cell sparing: possible role in persistent infection by vesicular stomatitis virus. Virology 85, 175-186.

122. SEYMOUR, L., 1964: Effect of actinomycin D and puromycin dihydrochloride on action of interferon. Virology 24, 586-588.

123. SHATKIN, A.J., 1969: Estimation of RNA, DNA and protein by the use of isotopic precursors followed by chemical fractionation. In: K. Habel und N.P. Salzman (Hrsgb.) Fundamental Techniques in Virology, 238-241. Academic Press, New York, San Fransisco.

124. SIEGL, G., 1976: The parvoviruses, In: S. Gard und C. Hallauer (Hrsgb.), Virology Monographs Bd. 15, Springer Verlag, Wien, New York.

125. Spendlove, R.S. 1967: Microscopie Techniques. II. Staining with acridin orange. In: Maromorosch K., und H. Koprowski-(Hrsgb.), Methods of Virology Bd. III, 506-520, Academic Press, New York, London.

126. SPIEGELMANN, S., A. BURNEY, R.M. DAS, J. KEYCLAR, J. SCHLOM, M. TRAVNIK und K. WATSON, 1970: Characterization of the prodults of RNA-directed DNA polymerases in oncogenic RNA viruses. Nature 227, 563-567.

127. SPROCKHOFF, H. von, 1958: Experimentelle Befunde bei der Borna-schen Krankheit. Untersuchungen über das Borna-S-Antigen und Infektionsversuche mit infantilen Kaninchen. Z. Immun. Forsch. 115, 161-168.

128. St. JEOR, S., und F. RAPP, 1973: Cytomegalovirus replication in cells pretreated with JUDR. J. Virol. 11, 986-990.

129. STOLLAR, V., T.M. STEVENS und R.W. SCHLESINGER, 1966: Studies on the nature of dengue viruses. II. Characterisation of viral RNA and effects of inhibitiors of RNA synthesis. Virology 30, 303-312.

130. STRYER, L. 1978: Biochemie. F. Vieweg und Sohn, Braunschweig, Wiesbaden.

131. SUBAK-SHARPE, H.H., M.C. TIMBURG und J.F. WILLIAMS, 1969: Rifampicin inhibits the growth of some mammalian viruses. Nature. 222, 341-345.

132. SUGIURA, A., M. UEDA und C. EUOMOTO, 1969: The effect of actinomycin D on the synthese of influenza virus-specific-RNA. Arch. ges. Virusforsch. 26, 105-117.

133. SZABO, C., und M. J. BISSELL, 1978: Antiviral action of a rifamycin derivative: Formation of Rous sarcoma virus particles deficient in 60 to 70 S RNA. J. Virol. 25, 944-947.

134. TAGAYA, I., und H. AMANO, 1977: Incomplete inhibition of variola virus focus formation in HeLa cell cultures by cytosin arabinoside. Microbiol. Immunol. 21, 335-338.

135. TAYLOR, J. 1964: Inhibition of interferon action by actinomycin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 447-451.

136. TAYLOR-ROBINSON, D., and A.E. CAUNT, 1972: Varicella Virus, In: S. Gard, C. Hallauer, K.F. Meyer (Hrsgb.), Virology Monographs Bd. 12, Springer Verlag, Wien, New York.

137. TEICH, N., D.R. LOWY, J.W. HARTLEY und W.P. ROWE, 1973: Studies of the mechanism of induction of infectious murine leukemia virus from AKR mouse embryo cell lines by 5-iododeoxyuridine and 5-bromo-deoxyuridine. Virology 51, 163-173.

138. TEMIN, M.M., 1963: The effects of actinomycin D on growth of Rous sarcoma virus in vitro. Virology 20, 577-582.

139. TEMIN, H.M., und S. MIZUTANI, 1970: RNA-dependent DNA-polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226, 1211-1213.

140. TER MEULEN, V., L.L. LEONARD, E.H. LENNETTE, M. KATZ und H. KOPROWSKI, 1972: The effect of 6-azauridine upon subacute sclerosing panencephalitis virus in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 1111-1115.

141. THIRY, L., und G. LANCINI, 1972: Mode of action of rifampicin and aminopiperacine derivates on animal viruses and cells. FEBS Symp. 22, 177-192.

142. TING, R.C., S.Y. STRINGER und R.C. GALLO, 1972: Reverse transcriptase, RNA tumor virus transformation on derivatives of rifamycin SV. Nature New Biology 236, 163-166.

143. TOZZINI, F., 1976: Enhancement of animal viruses growth on RK_{13} cells pretreated with 6-azauridine. Boll. Ist. Sieroter. Milanese 55, 279-283.

144. UNDERWOOD, B., und F. BROWN, 1974: Physico-chemical characterisation of Rinderpest-Virus. Med. Microbiol. Immunol. 160, 125-132.

145. VÁCZI, L., und E. GÖNCZÖL, 1973: The effect of cytosine-arabinoside on the multiplication of cytomegalovirus and of the formation of virus-induced intracellular antigens. Acta Virol. 17, 189-195.

146. VAHERI, A., und H. HANAFUSA, 1971: Effect of rifampicin and a derivative on cells transformed by Rous sarcoma virus. Cancer Res. 31, 2032-2036.

147. WAN, C.W., und T.W. MAK, 1979: Inhibition of murine sarcoma virus - induced foci formation by cytidine analogues and other drugs chemotherapeutically effective in human malignancies. Intervirology 11, 291-299.

148. WEIS, K.E., 1968: Lumpy skin disease virus, In: S. Gard, C. Hallauer und K.F. Meyer (Hrsgb.), Virology Monographs Bd. 3, 111-131, Springer-Verlag, Wien, New York.

149. WERNER, G.H., P. GANTER und Y. DE ROTULD, 1964: zitiert nach Y. BECKER, 1976 (7)

150. WIGAND, R., und J. SCHMIEDER, 1972: Inhibition of adenovirus multiplication by metabolic inhibitors. Arch. ges. Virusforsch. 42, 324-338.

151. WIGAND, R., A. VNJIC und M. SCHÖNER, 1974: Inhibition of adenovirus multiplication by rifampicin derivates. Acta virol. 18, 113-120.

152. WILSON, D.E., und P. LO GERFO, 1964: Inhibition of ribonucleic acid synthesis in Newcastle-diesease-virus-infected cells by puromycin and 6-Azauridine. J. Bact. 88, 1550-1555.

153. WU, A.M. und R.C. GALLO, 1975: Reverse transcriptase. CRC, Critical Reviews in Biochemistry, 289-347, National Institutes of Health Bethesda ,Maryland, USA.

154. YANG, S.S., F.M. HERRERA, R.G. SMITH, M.S. REITZ, G. LANCINI, R.C. TING und R.C. GALLO, 1972: Rifamycin antibiotics: Inhibitors of Rauscher murine leukemia virus reverse transcriptase and of purified DNA polymerases from human normal and leukemic lymphoblasts. J.Nat. Cancer Instit. 49, 7-25.

155. ZOZIKOV,W.und C.MIETENS, 1974: Vermehrung virulenter und attenuierter Polioviren bei Hemmung der Interferon-synthese mit Actinomycin D., Immun. Infekt. 2, 83-84.

Am Ende der Arbeit danke ich Herrn Prof.Dr.DDr.h.c. A. Mayr für die freundliche Überlassung des Arbeitsthemas. Auch bedanke ich mich bei ihm, sowie bei Herrn Prof. Dr. W. Gössner für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Danner für die Anleitung, wertvolle Anregung und jederzeit freundlich gewährte Hilfe im Institut für Med. Mikrobiologie und Herrn Dr. V. Erfle für die Betreuung und hilfreiche Unterstützung in der GSF.

Für die technische Assistenz bedanke ich mich bei Frau B. von Restorff und Frau M. Kothny.

L E B E N S L A U F

Am 30. Januar 1953 wurde ich, Dorothea Weber, als zweites Kind des Pfarrers Wilhelm Weber und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Kästel, in Mannheim geboren.

Nach 4 Jahren Grundschule (1959 - 1963) in Mannheim-Gartenstadt besuchte ich das Joh.-Seb.-Bach-Gymnasium in Mannheim-Neckarau (1963-1969), wechselte anschließend in die Albertus-Magnus-Schule in Viernheim über, wo ich 1972 mein Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1972/1973 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, das ich von Sommersemester 1973 an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München fortsetzte und 1977 mit dem Staatsexamen abschloß.

Am 13. Dezember 1977 erhielt ich meine Approbation als Tierärztin.

Die vorliegende Arbeit begann ich im Dezember 1977 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Bei der Bearbeitung des Themas wurde ich durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz unterstützt.